

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12N 15/00, C12P 7/00	A1	(11) 国際公開番号 WO95/18220 (43) 国際公開日 1995年7月6日(06.07.95)						
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP94/02220</p> <p>(22) 国際出願日 1994年12月26日(26.12.94)</p> <p>(30) 優先権データ</p> <table border="0"> <tr> <td>特願平5/348737</td> <td>1993年12月27日(27.12.93)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平6/235917</td> <td>1994年09月05日(05.09.94)</td> <td>JP</td> </tr> </table> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 麒麟麦酒株式会社 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒104 東京都中央区新川二丁目10番1号 Tokyo, (JP) 株式会社海洋バイオテクノロジー研究所 (MARINE BIOTECHNOLOGY INSTITUTE CO., LTD.)(JP/JP) 〒113 東京都文京区本郷一丁目28番10号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者：および</p> <p>(75) 発明者／出願人 (米国についてののみ) 三沢典彦(MISAWA, Norihiko)[JP/JP] 近藤恵二(KONDO, Keiji)[JP/JP] 梶原將(KAJIWARA, Susumu)[JP/JP] 〒236 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟麦酒株式会社 基盤技術研究所内 Kanagawa, (JP)</p>		特願平5/348737	1993年12月27日(27.12.93)	JP	特願平6/235917	1994年09月05日(05.09.94)	JP	<p>横山昭裕(YOKOYAMA, Akihiro)[JP/JP] 〒424 静岡県清水市袖師町1900番 株式会社海洋バイオテクノロジー研究所 清水研究所内 Shizuoka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 佐藤一雄, 外(SATO, Kazuo et al.) 〒100 東京都千代田区丸の内三丁目2番3号 富士ビル323号 協和特許法律事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, JP, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許(KE, MW, SD, SZ).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
特願平5/348737	1993年12月27日(27.12.93)	JP						
特願平6/235917	1994年09月05日(05.09.94)	JP						
<p>(54) Title : DNA CHAIN USEFUL FOR XANTHOPHYLL SYNTHESIS AND PROCESS FOR PRODUCING XANTHOPHYLLS</p> <p>(54) 発明の名称 キサントフィルの合成に有用なDNA鎖およびキサントフィルの製造法</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The following DNA chains relate to xanthophylls having a keto group, represented by astaxanthin, and the following technique relates to a genetically engineered production of xanthophylls: a DNA chain having a base sequence coding for a polypeptide having an enzymatic activity of converting the 4-methylene group of a β-ionone ring into a keto group; a DNA chain having a base sequence coding for a polypeptide having an enzymatic activity of converting the 4-methylene group of a 3-hydroxy-β-ionone ring into a keto group; a DNA chain having a base sequence coding for a polypeptide having an enzymatic activity of adding a hydroxyl group to the 3-carbon atom of a 4-keto-β-ionone ring; and a process for producing various xanthophylls, such as canthaxanthin and astaxanthin, by introducing the above DNA chain(s) into a suitable microorganism, e.g., <u>Escherichia coli</u>, followed by expression thereof.</p>								

(57) 要約

アスタキサンチンを始めるとするケト基を含むキサントフィルに関する下記のようなDNA鎖およびキサントフィルの遺伝子工学的製造に関する技術が開示されている。

β -イオノン環 (β -ionone ring) の4位のメチレン (methylene) 基をケト (keto) 基に変換する酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

3-ヒドロキシ- β -イオノン環 (3-hydroxy- β -ionone ring) の4位のメチレン (methylene) 基をケト (keto) 基に変換する酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

4-ケト- β -イオノン環 (4-keto- β -ionone ring) の3位の炭素に1つの水酸基を付加する酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

上記のDNA鎖を適当な微生物、たとえば大腸菌に導入してこれを発現させることにより、カンタキサンチン、アスタキサンチンなど種々のキサントフィルを製造することができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AT	オーストリア	ES	スペイン	LR	リベリア	SD	スーダン
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BG	ブルガリア	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャード
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MR	モリタニア	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MW	マラウイ	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	US	米国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	PL	ポーランド	VN	ヴェトナム
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア		

明 細 書

キサントフィルの合成に有用なDNA鎖および
キサントフィルの製造法

技術分野

本発明は、タイ、サケ、エビ等の養殖魚介類の色揚げに有用であり、また、着色料や抗酸化剤として食品に利用されるアスタキサンチン等のケト基を含むキサントフィル(ケトカロチノイド)の合成に有用なDNA鎖、及び、このDNA鎖を導入した微生物を利用したアスタキサンチン等のケト基を含むキサントフィル(ケトカロチノイド)の製造法に関するものである。

背景技術

キサントフィル(xanthophyll)とは、水酸基、ケト基、エポキシ基などの酸素を含むカロチノイド(carotenoid)色素の総称である。カロチノイドは、メバロン酸を出発物質として、ステロイドやテルペノイドと途中まで共通なイソプレノイド生合成経路によって合成される。イソプレン基本生合成系によって生じたC₁₅のファルネシルピロリン酸(FPP)は、C₅のイソペンテニルピロリン酸(IPP)と縮合することにより、C₂₀のゲラニルゲラニルピロリン酸(GGPP)が作られる。次に、2分子のGGPPが縮合して、最初のカロチノイドである無色のフィ

トエン (phytoene) が合成される。フィトエンは、一連の不飽和反応により、フィトフルエン (phytofluene)、 ξ -カロチン (ξ -carotene)、ノイロスポレン (neurosporene)、リコピン (lycopene) に変換され、さらに、このリコピンは環化反応により β -カロチン (β -carotene) に変換される。そして、 β -カロチンに水酸基やケト基などが導入され、種々のキサントフィルが合成されると考えられている (Britton, G., 'Biosynthesis of carotenoids', Plant Pigments. London, Academic Press, 1988, p.133-182. (Goodwin, T. W. ed.) 参照)

。

最近、発明者らは、植物常在非光合成細菌 Erwinia uredovora のカロチノイド生合成遺伝子群を、その黄色の色調を指標に大腸菌にクローニングし、これらの遺伝子のいろいろな組み合わせを大腸菌等の微生物で発現させることにより、大腸菌等の微生物に、フィトエン、リコピン、 β -カロチン、および、 β -カロチンに水酸基が導入された黄色のキサントフィルであるゼアキサントシンを生産させることを可能にした (図10参照) (Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Iizawa, Y., Nakamura, K., Harashima K., 'Elucidation of the Erwinia uredovora carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in Escherichia coli'. J. Bacteriol., 172

, p. 6704-6712, 1990、及び、Misawa, N., Yamano, S., Ikenaga, H., 'Production of β -carotene in Zyomonas mobilis and Agrobacterium tumefaciens by introduction of the biosynthesis genes from Erwinia uredovora'. Appl. Environ. Microbiol., 57, p. 1847-1849, 1991、及び、本発明者らによる特許出願特願平3-58786号公報（特願平2-53255号明細書）：「カロチノイドの合成に有用なDNA鎖」参照）。

一方、赤色のキサントフィルであるアスタキサンチンは、特に海洋生物のタイ、サケ等の赤色魚類や、カニ、エビ等の甲殻類に広く存在する代表的動物カロチノイドである。一般に、動物はカロチノイドを生合成することができないので、微生物や植物によって合成されたカロチノイドを外界より摂取する必要がある。そのため、従来より、タイ、サケ、エビ等の養殖魚介類の色揚げの目的にアスタキサンチンは広く用いられてきた。また、アスタキサンチンは、食品においても、着色料としてだけではなく、癌の原因となる生体内で発生する活性酸素を除去する抗酸化剤としても注目を集めている（松野隆男、幹渉、「動物におけるカロテノイドの生理機能と生物活性」化学と生物、28, p. 219-227, 1990 参照）。アスタキサンチンの供給源としては、南極オキアミ等の甲殻類、酵母 Phaffia の培養物、緑藻 Haematococcus の培養物、及び、有機合成法が知られている。しかし、南極オ

キアミ等の甲殻類を用いる場合、その採取、抽出において、脂質を始めとする夾雑物との分離等において多大な労力とコストを有する。また、酵母 Phaffia の培養物においては、その細胞壁が強固でしかも生産量が低いため、アスタキサンチンの採取、抽出に多大なコストを有する。緑藻 Haematococcus の培養物においては、その培養時には、アスタキサンチン合成に欠くことのできない光を供給しなければならず、太陽光採取のための立地条件や人工光供給のための培養装置等の設備が必要であるだけでなく、混在する副生産物の脂肪酸エステルや混在するクロロフィルとの分離が困難である。以上のことから上記の生物起源のアスタキサンチンは、コスト的に、有機合成法に勝てないのが現状であった。しかしながら、有機合成法においては、アスタキサンチンが魚介類の飼料や食品添加剤として用いられることを考慮すると、反応時に生ずる副生成物等の面で問題が残し、また、消費者の天然物嗜好にも反している。以上のことより、安全で消費者イメージのよい生物起源の安価なアスタキサンチンの供給、製造法の開発が望まれている。

発明の開示

もし、アスタキサンチンの生合成を担う遺伝子群があれば非常に有用であると考えられる。なぜなら、アスタキサンチンの産生能の有無にかかわらず、食品としての安全性やアスタキサンチンの潜在的生産能の面で最適

な微生物に、アスタキサンチン合成遺伝子群を導入することにより、その生産能を与えることができるからである。この場合、混在する副生産物の問題もなく、今日の進んだ遺伝子操作の手法をもって、有機合成法を凌駕するレベルまでアスタキサンチンの生産量を上げることも難しくないと思われる。しかしながら、キサントフィルの1種であるゼアキサンチンまでを合成する遺伝子群は、前述した様にすでに本発明者等によって取得されているが、アスタキサンチンを合成するのに必要なケト基導入酵素をコードする遺伝子等の取得は未だ誰も成功に至ってはいない。この原因としては、ケト基導入酵素は膜タンパク質であり、膜から分離すると活性を失うため、その酵素精製、活性測定が不可能であり、酵素の知見が皆無であったことが挙げられる。したがって、今日まで、アスタキサンチンを遺伝子操作により微生物等に生産させることは不可能であった。

本発明は、アスタキサンチンを始めとするケト基を含むキサントフィル（ケトカロチノイド）を生産するのに必要なケト基導入酵素をコードする遺伝子等を取得することにより、微生物にアスタキサンチンを始めとするケト基を含むキサントフィル（ケトカロチノイド）を生産させるのに必要な遺伝子群を含むDNA鎖、および、このDNA鎖を導入した微生物を利用した、アスタキサンチンを始めとするケト基を含むキサントフィル（ケトカロチ

ノイド)の製造法を提供することを目的とするものである。

通常よく使われる遺伝子クローニング法である、目的とするタンパク質の精製、アミノ酸配列の一部決定、および、合成プローブによる遺伝子の取得法は、アスタキサンチン合成酵素の精製が不可能であることより採用できないことは前述したとおりである。そこで、本発明者等は、非光合成細菌エルビニア (*Erwinia*) のカロチノイド合成遺伝子群が大腸菌で機能することに注目し、その遺伝子群の組み合わせによって、アスタキサンチンの生合成中間体であると考えられるリコピンや β -カロチンを大腸菌で作らせ、これらの大腸菌をアスタキサンチン合成遺伝子のクローニングのための宿主とした。本発明者等は、また、いくつかの海洋細菌がアスタキサンチンを生産できること (Yokoyama, A., Izumida, H., Miki, W., 'Marine bacteria produced astaxanthin', 10th International symposium on carotenoids, abstract, CL11-3, 1993)、および、細菌の場合は一連の関連遺伝子がクラスター(群)を構成しているかもしれないこと、および、細菌の場合は大腸菌でその遺伝子群が機能発現するかもしれないことに注目し、この海洋細菌を遺伝子源として選んだ。これら2つの手段を組み合わせる研究を行うことにより、海洋細菌よりアスタキサンチンやその他のケト基を含むキサントフィルの生合成に必要

な遺伝子群の取得に成功し、本発明を完成させるに至った。なお、海洋細菌でアスタキサンチン合成遺伝子群がクラスターを構成しており、大腸菌で機能発現すること、および、これらの遺伝子産物が β -カロチンまたはリコピンを基質として利用できることは、本発明において始めて明かにされたのである。

本発明によるDNA鎖は下記に示すものである。

(1) β -イオノン環 (β -ionone ring) の4位のメチレン (methylene) 基をケト (keto) 基に変換する酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(2) β -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号1に示したアミノ酸番号1から212までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(3) 上記(2)に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ上記(2)に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(4) β -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号5に示したアミノ酸番号1から242までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(5) 上記(4)に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ上記(4)に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(6) β -カロチンをエキネノンを経てカンタキサンチンに変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号1に示したアミノ酸番号1から212までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(7) 上記(6)に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ上記(6)に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(8) β -カロチンをエキネノンを経てカンタキサンチンに変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号5に示したアミノ酸番号1から242までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(9) 上記(8)に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ上記(8)に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(10) 3-ヒドロキシ- β -イオノン環(3-hydroxy- β -ionone ring)の4位のメチレン(methylene)基をケト(keto)基に変換する酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(11) 3-ヒドロキシ- β -イオノン環の4位のメチ

レン基をケト基に変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号 1 に示したアミノ酸番号 1 から 2 1 2 までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有する DNA 鎖。

(12) 上記 (11) 記載の DNA 鎖にハイブリダイズし、かつ上記 (11) に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有する DNA 鎖。

(13) 3 - ヒドロキシ - β - イオノン環の 4 位のメチレン基をケト基に変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号 5 に示したアミノ酸番号 1 から 2 4 2 までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有する DNA 鎖。

(14) 上記 (13) に記載の DNA 鎖にハイブリダイズし、かつ上記 (13) に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有する DNA 鎖。

(15) ゼアキサンチンを 4 - ケトゼアキサンチンを経てアスタキサンチンに変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号 1 に示したアミノ酸番号 1 から 2 1 2 までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有する DNA 鎖。

(16) 上記 (15) に記載の DNA 鎖にハイブリダイズし、かつ上記 (15) に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有する DNA 鎖。

(17) ゼアキサンチンを 4 - ケトゼアキサンチンを経

てアスタキサンチンに変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号 5 に示したアミノ酸番号 1 から 242 までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有する DNA 鎖。

(18) 上記 (17) に記載の DNA 鎖にハイブリダイズし、かつ上記 (17) に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有する DNA 鎖。

(19) 4 - ケト - β - イオノン環 (4-keto- β -ionone ring) の 3 位の炭素に 1 つの水酸基を付加する酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有する DNA 鎖。

(20) 4 - ケト - β - イオノン環の 3 位の炭素に 1 つの水酸基を付加する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号 2 に示したアミノ酸番号 1 から 162 までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有する DNA 鎖。

(21) 上記 (20) に記載の DNA 鎖にハイブリダイズし、かつ上記 (20) に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有する DNA 鎖。

(22) 4 - ケト - β - イオノン環の 3 位の炭素に 1 つの水酸基を付加する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号 6 に示したアミノ酸番号 1 から 162 までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有する DNA 鎖。

(23) 上記(22)に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ上記(22)に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(24) カンタキサンチンをフェニコキサンチンを経てアスタキサンチンに転換する酵素活性を有してアミノ酸配列が実質的に配列番号2に示したアミノ酸番号1から162までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(25) 上記(24)に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ上記(24)に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(26) カンタキサンチンをフェニコキサンチンを経てアスタキサンチンに転換する酵素活性を有してアミノ酸配列が実質的に配列番号6に示したアミノ酸番号1から162までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(27) 上記(26)に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ上記(26)に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

本発明は、また、キサントフィルの製造法にも関する。

すなわち、本発明によるキサントフィルの製造法は下記に示すものである。

(1) 上記(1)～(9)のいずれか1項に記載のDNA鎖を、 β -カロチンを産生する能力を有する微生物に

導入して該形質転換微生物を培地で培養し、培養物からカンタキサンチンまたはエキネノンを採取することを特徴とする、キサントフィルの製造法。

(2) 上記(10)～(18)のいずれか1項に記載のDNA鎖を、ゼアキサンチンを産生する能力を有する微生物に導入して該形質転換微生物を培地で培養し、培養物からアスタキサンチンまたは4-ケトゼアキサンチンを採取することを特徴とする、キサントフィルの製造法。

(3) 上記(19)～(27)のいずれか1項に記載のDNA鎖を、カンタキサンチンを産生する能力を有する微生物に導入して該形質転換微生物を培地で培養し、培養物からアスタキサンチンまたはフェニコキサンチンを採取することを特徴とする、キサントフィルの製造法。

(4) 微生物が細菌または酵母である、上記(1)～(3)のいずれか1項に記載の製造法。

図面の簡単な説明

第1図は、海洋細菌 Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1 のケト基導入酵素遺伝子 (crtW 遺伝子) の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を示す説明図である。

第2図は、海洋細菌 Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1 の水酸基導入酵素遺伝子 (crtZ 遺伝子) の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を示す説明図である。

第3図は、海洋細菌 Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1 のリコピン環化酵素遺伝子 (crtY 遺伝子) の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を示す説明図である。

第4図は、第3図に続く配列を示す説明図である。

第5図は、海洋細菌 Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1 のキサントフィル合成遺伝子群の塩基配列を示す説明図である。

図中のAからFは、第1図から第4図のAからFに対応している。

第6図は、第5図に続く配列を示す説明図である。

第7図は、第6図に続く配列を示す説明図である。

第8図は、第7図に続く配列を示す説明図である。

第9図は、第8図に続く配列を示す説明図である。

第10図は、非光合成細菌 Erwinia uredovora のカロチノイド生合成経路とカロチノイド合成遺伝子の機能を示す説明図である。

第11図は、海洋細菌 Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1 および Alcaligenes sp. 10-1 の主要なキサントフィル生合成経路とキサントフィル合成遺伝子の機能を示す説明図である。

ただし、crtY 遺伝子の機能は前者においてのみ確認。

第12図は、海洋細菌 Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1 のキサントフィル合成遺伝子(群)を含む

いろいろなデレーションプラスミドを示す説明図である。

白抜きの P は、ベクター pBluescript II SK の lac のプロモーターを示している。制限酵素切断部位は次のように省略して示されている。 Sa, SacI; X, XbaI; B, BamHI; P, PstI; E, EcoRI; S, Sall; A, Apal; K, KpnI; S t, StuI; N, NruI; Bg, BglII; Nc, NcoI; Hc, HincII .

第 13 図は、海洋細菌 Alcaligenes sp. PC-1 のケト基導入酵素遺伝子 (crtW 遺伝子) の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を示す説明図である。

第 14 図は、第 13 図に続く配列を示す説明図である。

第 15 図は、海洋細菌 Alcaligenes sp. PC-1 の水酸基導入酵素遺伝子 (crtZ 遺伝子) の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を示す説明図である。

第 16 図は、海洋細菌 Alcaligenes sp. PC-1 のキサントフィル合成遺伝子群の塩基配列を示す説明図である。図中の A から D は、図 13 ~ 図 15 の A から D に対応している。

第 17 図は、第 16 図に続く配列を示す説明図である。

第 18 図は、第 17 図に続く配列を示す説明図である。

第 19 図は、海洋細菌 Alcaligenes sp. PC-1 のキサントフィル合成遺伝子 (群) を含むいろいろなデレーションプラスミドを示す説明図である。

白抜きの P は、ベクター pBluescript II SK+ の lac のプロモーターを示している。

第 20 図は、海洋細菌 Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1 および Alcaligenes sp. PC-1 のマイナーな生合成経路を含むキサントフィル生合成経路とキサントフィル合成遺伝子の機能を示す説明図である。

マイナーな生合成経路は点線の矢印で示されている。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、海洋細菌であるアグロバクテリウム Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1 および Alcaligenes sp. PC-1 に由来するアスタキサンチン等のケト基を含むキサントフィル（ケトカロチノイド）の合成に有用な DNA 鎖、及び、この DNA 鎖を導入した微生物を利用したアスタキサンチン等のケト基を含むキサントフィル（ケトカロチノイド）、すなわち、アスタキサンチン、フェニコキサンチン、4-ケトゼアキサンチン、カンタキサンチン、及び、エキネノンの製造法を提供するものである。

本発明による DNA 鎖は、ファインケミカル生成反応の点から原理、原則的には、前記（1），（10）および（19）により示され、基本的には、前記（2），（4），（11），（13），（20）および（22）により定義されるものである。DNA 鎖（2）および（4）の具体例が前記（6）および（8）であり、DNA 鎖（11）および（13）の具体例が前記（15）および（17）であり、さらに、DNA 鎖（20）および（22）の具体例が前記（24）および

(26) である。なお、DNA 鎖 (3), (5), (7), (9), (12), (14), (16), (18), (21), (23), (25) および (27) は、それぞれ、DNA 鎖 (2), (4), (6), (8), (11), (13), (15), (17), (20), (22), (24) および (26) に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするものである。

本発明による DNA 鎖がコードするポリペプチドは、アミノ酸配列が実質的に配列番号 1 ~ 2 及び 5 ~ 6 (第 1 ~ 2 図及び第 13 ~ 15 図) における前記したような特定範囲 (たとえば配列番号 1 (第 1 図) ではアミノ酸番号 1 ~ 212 の配列であるアミノ酸配列 (第 1 図では A ~ B)) を有するものである。本発明において、これらの DNA 鎖によってコードされる 4 種のポリペプチド (すなわちキサントフィル生成反応に関与する 4 種の酵素) は、前述のような酵素活性を有する限りアミノ酸のいくつかについて欠失、置換、付加等の変化があってもよい (実施例 13 参照)。このことは、「アミノ酸配列が実質的に --- 」ということと対応している。たとえば、この酵素の第 1 番目のアミノ酸 (Met) が欠失しているものなどもこのアミノ酸配列の変化によるポリペプチドないしは酵素に包含される。なお、各ポリペプチドをコードする本発明 DNA 鎖は、配列番号 1 ~ 2 及び 5 ~ 6 (第 1 ~ 2 図及び第 13 ~ 15 図) に示した特定範囲の塩基配列

をもつものの他に、縮重コドンにおいてのみ異なる同一のポリペプチドをコードする縮重異性体をも包含するものであることはいうまでもない。

ケト基導入酵素遺伝子 (crtW)

DNA 鎖 (1) ~ (18) はケト基導入酵素をコードする遺伝子 (crtW と命名) である。この典型的な例は、海洋細菌 Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1 または Alcaligenes sp. PC-1 よりクローニングした crtW 遺伝子であり、第 1 図の A から B (配列番号 1 のアミノ酸番号 1 ~ 212) または第 13 ~ 14 図の A から B (配列番号 5 のアミノ酸番号 1 ~ 242) までのアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列からなる DNA 鎖である。crtW 遺伝子産物 (以下 CrtW と呼ぶ) は、 β -イオノン環 (β -ionone ring) の 4 位のメチレン (methylene) 基をケト (keto) 基に転換する酵素活性を有しており、その具体的な例の 1 つが、 β -カロチン (β -carotene) を基質としてエキネノン (echinenone) を経てカンタキサンチン (canthaxanthin) を合成する酵素活性である (第 11 図参照)。さらに、crtW 遺伝子産物は、3-ヒドロキシ- β -イオノン環 (3-hydroxy- β -ionone ring) の 4 位のメチレン (methylene) 基をケト (keto) 基に転換する酵素活性も有しており、その具体的な例の 1 つが、ゼアキサンチン (zeaxanthin) を基質として 4-ケトゼアキサンチン (4-ke

tozeaxanthin) を経てアスタキサンチン (astaxanthin) を合成する酵素活性である (第 11 図参照)。なお、このような酵素活性を有するポリペプチドおよびこれをコードする DNA 鎖は、従来知られていなかったものであり、このポリペプチドまたはこれをコードする DNA 鎖は、現在までに知られているどのようなポリペプチドまたは DNA 鎖とも全体的なホモロジーは有していない。また、 β -イオノン環や 3-ヒドロキシ- β -イオノン環に限らず、1つの酵素がジハイドロカルボニル基を直接ケト基に変換するという知見は今まで無かったものである。なお、Agrobacterium と Alcaligenes 間の CrtW のホモロジーは、アミノ酸配列レベルで、83% のアイデンティティーという高いホモロジーを示した。

一方、非光合成細菌 Erwinia のカロチノイド合成遺伝子を用いることにより、大腸菌等の微生物に β -カロチンやゼアキサンチンを作らせることができる、すなわち、Erwinia の crtE、crtB、crtI、crtY 遺伝子は、大腸菌等の微生物に β -カロチン生産能を与え、Erwinia の crtE、crtB、crtI、crtY、crtZ 遺伝子は、大腸菌等の微生物にゼアキサンチン生産能を与える (第 10 図および前記の W091/13078 号公開公報参照)。したがって、CrtW の基質は、これら Erwinia の crt 遺伝子群により供給されるので、上記の Erwinia の crt 遺伝子群を含む大腸菌等の微生物にさらに crtW 遺伝子を導入すると、

β -カロチン産生微生物では、エキネノンを経てカンタキサンチンを、ゼアキサンチン産生微生物では、4-ケトゼアキサンチンを経てアスタキサンチンを生産するようになる。

水酸基導入酵素遺伝子 (*crtZ*)

DNA 鎖 (19) ~ (27) は水酸基導入酵素をコードする遺伝子 (*crtZ* と命名) である。この典型的な例は、海洋細菌 *Agrobacterium aurantiacus* sp. nov. MK1 または *Alcaligenes* sp. PC-1 よりクローニングした *crtZ* 遺伝子であり、第 2 図の C から D (配列番号 2 のアミノ酸番号 1 ~ 162) または第 15 図の C から D (配列番号 6 のアミノ酸番号 1 ~ 162) までのアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列からなる DNA 鎖である。*crtZ* 遺伝子産物 (以下 *CrtZ* と呼ぶ) は、 β -イオノン環 (β -ionone ring) の 3 位の炭素に 1 つの水酸基を付加する酵素活性を有しており、その具体的な例の 1 つが、 β -カロチン (β -carotene) を基質として β -クリプトキサンチン (β -cryptoxanthin) を経てゼアキサンチン (zeaxanthin) を合成する酵素活性である (第 11 図参照)。さらに、*crtZ* 遺伝子産物は、4-ケト- β -イオノン環 (4-keto- β -ionone ring) の 3 位の炭素に 1 つの水酸基を付加する酵素活性も有しており、その具体的な例の 1 つが、カンタキサンチン (cantaxanthin) を基質としてフェニコキサンチン (phoeni-

coxanthin) を経てアスタキサンチン (astaxanthin) を合成する酵素活性である (第 11 図参照)。なお、後者の酵素活性を有するポリペプチドおよびこれをコードする DNA 鎖は、従来知られていなかったものである。また、Agrobacterium および Alcaligenes の CrtZ は、アミノ酸配列レベルで、Erwinia uredovora の CrtZ とそれぞれ、57% および 58% のアイデンティティという高いホモロジーを有した。なお、Agrobacterium と Alcaligenes 間の CrtZ のホモロジーは、アミノ酸配列レベルで、90% のアイデンティティという高いホモロジーを示した。

非光合成細菌 Erwinia のカロチノイド合成遺伝子を用いることにより、大腸菌等の微生物に β -カロチンを作らせることができるのは前述のとおりである。さらに、これに crtW を加えると、大腸菌等の微生物にカンタキサンチンを作らせることができるのも前述のとおりである。したがって、Agrobacterium または Alcaligenes の CrtZ の基質は、Erwinia の crtE、crtB、crtI、crtY 遺伝子 (β -カロチンの生産)、および、これらに Agrobacterium または Alcaligenes の crtW 遺伝子を加えたもの (カンタキサンチンの生産) により供給されるので、これらの crt 遺伝子群を含む大腸菌等の微生物に Agrobacterium または Alcaligenes の crtZ 遺伝子を導入すると、 β -カロチン産生微生物では、 β -クリプトキ

サンチンを経てゼアキサンチンを、カンタキサンチン産生微生物では、フェニコキサンチンを経てアスタキサンチンを生産するようになる。

リコピン環化酵素遺伝子 (crtY)

アミノ酸配列が実質的に第3および4図のEからF (配列番号3のアミノ酸番号1~386) までのアミノ酸配列をコードするDNA鎖は、リコピン環化酵素をコードする遺伝子 (crtYと命名) である。この典型的な例は、海洋細菌 Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1 よりクローニングした crtY 遺伝子であり、第3および4図のEからFまでのアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列からなるDNA鎖である。 crtY 遺伝子産物 (以下 CrtY と呼ぶ) は、リコピン (lycopene) を基質として β -カロチン (β -carotene) を合成する酵素活性を有している (第11図参照)。非光合成細菌 Erwinia のカロチノイド合成遺伝子を用いることにより、大腸菌等の微生物にリコピンを作らせることができる、すなわち、Erwinia の crtE、crtB、crtI 遺伝子は、大腸菌等の微生物にリコピン生産能を与える (第10図および前記のW091/13078号公開公報参照)。したがって、Agrobacterium の CrtY の基質は、Erwinia の crt 遺伝子群により供給されるので、上記の Erwinia の crt 遺伝子群を含む大腸菌等の微生物に Agrobacterium の crtY を導入すると、 β -カロチンを生産させることが可能と

なる。

なお、Agrobacterium の CrtY は、アミノ酸配列レベルで、Erwinia uredovora の CrtY と 44.3% のアイデンティティーという意義深いホモロジーを有しており、酵素の機能も両者で同一である（第 10 図、第 11 図参照）。

海洋細菌の菌学的性質

キサントフィル合成遺伝子の取得源となった海洋細菌である Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1 および Alcaligenes sp. PC-1 は、下記のような菌学的性質を示す。

< Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1 >

(1) 形態

菌の形・大きさ：桿状、 $0.9 \mu\text{m} \times 1.2 \mu\text{m}$

運動性：あり

鞭毛：周毛あり

細胞の多形成：なし

胞子の形成：なし

グラム染色：陰性

(2) 各培地における生育状況

肉汁寒天平板培養：非拡散性で光沢を有する、橙色の円形コロニーを形成する。

肉汁寒天斜面培養：非拡散性で光沢を有する、橙色の帯状に生育する。

肉汁液体培養：培地全体に均一に生育し、橙色を示す。

肉汁ゼラチン穿刺培養：穿刺孔を中心に表面に生育する。

(3) 生理学的性質

硝酸塩の還元：陽性

脱窒反応：陰性

インドールの生成：陰性

クエン酸の利用：陰性

色素の生成：脂溶性の赤橙色色素

ウレアーゼ活性：陰性

オキシダーゼ活性：陽性

カタラーゼ活性：陽性

β -グルコシダーゼ活性（エスクリン分解性）：陽性

β -ガラクトシダーゼ活性：陽性

生育の範囲：PH5 ～ 9、温度 10 ～ 40℃

酸素に対する態度：好気性

海水耐性：陽性

O-Fテスト：酸化

糖類の同化能：

陽性：D-グルコース、D-マンノース、D-ガラクトース、D-フルクトース、乳糖、麦芽糖、ショ糖、グリコーゲン、N-アセチル-D-グルコサミン

陰性：L-アラビノース、D-マンニトール、イノシロール、L-ラムノース、D-ソルビトール

有機酸の同化能：

陽性：乳酸塩

陰性：クエン酸塩、リンゴ酸塩、グルコン酸塩、カブリン酸塩、コハク酸塩、アジピン酸塩

他の有機物の資化能：

陽性：イノシン、ウリジン、グルコース-1-リン酸、グルコース-6-リン酸

陰性：ゼラチン、L-アルギニン、DNA、カゼイン

< Alcaligenes sp. PC-1 >

(1) 形態

菌の形・大きさ：短桿状、1.4 μ m

運動性：あり

鞭毛：周毛あり

細胞の多形成：なし

胞子の形成：なし

グラム染色：陰性

(2) 各培地における生育状況

肉汁寒天平板培養：非拡散性で光沢を有する、橙色の円形コロニーを形成する。

肉汁寒天斜面培養：非拡散性で光沢を有する、橙色の帯状に生育する。

肉汁液体培養：培地全体に均一に生育し、橙色を示す。

肉汁ゼラチン穿刺培養：穿刺孔を中心に表面に生育する。

(3) 生理学的性質

色素の生成：脂溶性の赤橙色色素

オキシダーゼ活性：陽性

カタラーゼ活性：陽性

生育の範囲：PH5 ～ 9 、温度 10 ～ 40℃

酸素に対する態度：好気性

海水耐性：陽性

O - F テスト：酸化

ゼラチン分解性：陰性

他の海洋細菌のキサントフィル合成遺伝子群

現在までに16種の海洋細菌がアスタキサンチン等のケトカロチノイドを合成することが報告されている (Yokoyama, A., Izumida, H., Miki, W., 'Marine bacteria produced astaxanthin', 10th International symposium on carotenoids, abstract, CL11-3, 1993)。前述した海洋細菌 Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1 または Alcaligenes sp. PC-1 の crt 遺伝子の内のいずれかをプローブとして用いれば、そのホモロジーを利用することによって、他のアスタキサンチン産生海洋細菌から、アスタキサンチンを始めとするケトカロチノイドの生合成を担う遺伝子群を取得することができるはずである。事実、発明者等は、Ag. aurantiacus sp. nov. MK1 の crtW と crtZ を含むDNA断片をプローブとして、Alcaligenes PC-1 の染色体DNAから、強くハイブリダイズするDNA断片として、crtW と crtZ 遺伝子

を取得したのであった（詳細は実施例を参照されたい）。さらに、発明者等は、アスタキサンチンを合成できる残りの14種の海洋細菌の中から Alteromonas SD-402 を選んで、これから染色体DNAを調製し、Ag. aurantiacus sp. nov. MK1 の crtW と crtZ を含むDNA断片をプローブとして、サザン法を行ったところ、予想どおり、このプローブはこの海洋細菌の染色体DNAに由来するバンドともハイブリダイズした。本発明によるDNA鎖は、このような前記DNA鎖(2), (4), (6), (8), (11), (13), (15), (17), (20), (22), (24) および (26) とハイブリダイズするDNA鎖を包含するものである。

DNA 鎖の取得

上記の各酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNA鎖を取得する一つの手段は、核酸合成の方法に従って、その鎖長の少なくとも一部を化学合成することであるが、結合アミノ酸が多数であるということを考えれば、この化学合成法よりも Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1 または Alcaligenes sp. PC-1 のトータルDNAを適当な制限酵素で消化したものを用いて大腸菌でライブラリーを作製し、このライブラリーから遺伝子工学の分野で慣用されている方法、たとえば適当なプローブによるハイブリダイゼーション法、により、これを取得するほうが好ましいと言える（他の海洋細菌の

キサントフィル合成遺伝子群参照)。

大腸菌等の微生物の形質転換および遺伝子発現

上述のような本発明DNA鎖を適当な細菌(例えば、大腸菌、*Zymomonas mobilis*、*Agrobacterium tumefaciens*)や酵母(例えば*Saccharomyces cerevisiae*)等の微生物に導入することにより、種々のキサントフィルを製造することができる。

以下は、好ましい微生物への外来遺伝子の導入法の概要について記載したものである。

大腸菌等の微生物への外来遺伝子の導入および発現のための手順ないし方法は、本発明において下記したところ以外のものにおいても、遺伝子工学の分野により慣用されているものを含み、その手法ないし方法(たとえば、'Vectors for cloning genes', Methods in Enzymology, 216, p.469-631, 1992, Academic Press、および、'Other bacterial systems', Methods in Enzymology, 204, p.305-636, 1991, Academic Press 参照)に準じて実施すればよい。

< 大腸菌 >

大腸菌への外来遺伝子の導入法は、ハナハンの方法、ルビジウム法などすでに確立されたいくつかの効率的方法があり、それを用いて行えばよい(たとえば、Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 'Molecular cloning -A laboratory manual,' Cold Spring Harbor

Laboratory Press, 1989 参照)。大腸菌での外来遺伝子の発現は常法に従って行えばよいが（たとえば、前述の 'Molecular cloning -A laboratory manual,' 参照）、たとえば、pUC 系や pBluescript 系等の lac のプロモーター等を有する大腸菌用ベクターを用いて行うことができる。発明者等は、lac のプロモーター等を有する大腸菌用ベクター pBluescript II SK または KS を用いて、lac のプロモーターの転写のリードスルーを受ける方向に、Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1 の crtW、crtZ、crtY 遺伝子および Alcaligenes sp. PC-1 の crtW、crtZ 遺伝子を挿入し、これらの遺伝子が大腸菌で発現させた。

< 酵母 >

酵母 Saccharomyces cerevisiae への外来遺伝子の導入法は、リチウム法などすでに確立された方法があり、それを用いて行えばよい（たとえば、秋山裕一監修バイオインダストリー協会編集、「酵母のニューバイオテクノロジー」医学出版センター 刊参照）。酵母での外来遺伝子の発現は、PGK や GPD 等のプロモーターおよびターミネーターを用いて、外来遺伝子をこのプロモーターとターミネーターの間に転写のリードスルーを受けるように挿入した発現カセットを構築し、この発現カセットを、S. cerevisiae のベクター、たとえば、YRp 系（酵母染色体の ARS 配列を複製起点とする酵母用マルチ

コピーベクター)、YEp系(酵母の2 μ m DNAの複製起点を持つ酵母用マルチコピーベクター)、YIp系(酵母の複製起点を持たない酵母染色体組込み用ベクター)等のベクターに挿入することにより行うことができる

(前述の「酵母のニューバイオテクノロジー」医学出版センター刊、日本農芸化学会ABCシリーズ「物質生産のための遺伝子工学」朝倉書店刊、および、Yamano, S., Ishii, T., Nakagawa, M., Ikenaga, H., Misawa, N., 'Metabolic engineering for production of β -carotene and lycopene in *Saccharomyces cerevisiae*', *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, P.1112-1114, 1994 参照)。

< Zymomonas mobilis >

エタノール生産細菌 Zymomonas mobilis への外来遺伝子の導入法は、グラム陰性菌に共通な接合伝達法により行うことができ、Zymomonas mobilis での外来遺伝子の発現は、たとえば Zymomonas mobilis 用ベクター pZA22 を用いて行うことができる(中村克己、「Zymomonas 細菌の分子育種」、日本農芸化学会誌, 63, p.1016-1018, 1989、および、Misawa, N., Yamano, S., Ikenaga, H., 'Production of β -carotene in Zymomonas mobilis and Agrobacterium tumefaciens by introduction of the biosynthesis genes from Erwinia uredovora' *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, p.1847-1849, 199

1 参照)。

< Agrobacterium tumefaciens >

植物病原細菌 Agrobacterium tumefaciens への外来遺伝子の導入法は、グラム陰性菌に共通な接合伝達法により行うことができ、Agrobacterium tumefaciens での外来遺伝子の発現は、たとえば Agrobacterium tumefaciens 用ベクター pBI121を用いて行うことができる (Mitsawa, N., Yamano, S., Ikenaga, H., 'Production of β -carotene in Zymomonas mobilis and Agrobacterium tumefaciens by introduction of the biosynthesis genes from Erwinia uredovora', Appl. Environ. Microbiol., 57, p.1847-1849, 1991 参照)。

微生物によるキサントフィル生産

前述した、微生物への外来遺伝子の導入および発現のための手法ないし方法によって、海洋細菌由来のアスタキサンチンを始めとするケトカロチノイド合成遺伝子群を導入し、発現させることが可能である。

ファルネシルピロリン酸 (FPP) はカロチノイドだけでなく、セスキテルペン、トリテルペン、ステロール、ホパノール等のテルペノイドと共通な基質である。一般に、微生物は、カロチノイドを合成できないものでも、テルペノイドは合成しているので、すべての微生物は、基本的に、中間代謝産物として FPPを有しているはずである。一方、非光合成細菌 Erwiniaのカロチノイド合成

遺伝子群は、PPP を基質として、Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1 または Alcaligenes sp. PC-1 の crt 遺伝子産物の基質、すなわち、リコピン、 β -カロチン、ゼアキサンチンまで合成させることが可能である（第10図参照）。発明者等は、大腸菌だけでなく前記した微生物、すなわち、酵母 Saccharomyces cerevisiae、エタノール生産細菌 Zymomonas mobilis、植物病原細菌 Agrobacterium tumefaciens に Erwinia の crt 遺伝子群を導入し、これらの微生物が、予想どおり、 β -カロチン等のカロチノイドを生産できるようになることを、すでに確認している（Yamano, S., Ishii, T., Nakagawa, M., Ikenaga, H., Misawa, N., 'Metabolic engineering for production of β -carotene and lycopene in Saccharomyces cerevisiae', Biosci. Biotech. Biochem., 58, P.1112-1114, 1994、Misawa, N., Yamano, S., Ikenaga, H., 'Production of β -carotene in Zymomonas mobilis and Agrobacterium tumefaciens by introduction of the biosynthesis genes from Erwinia uredovora', Appl. Environ. Microbiol., 57, p.1847-1849, 1991、および、本発明者らによる特許出願特願平3-58786号公報（特願平2-53255号明細書）：「カロチノイドの合成に有用なDNA鎖」）。

したがって、Erwinia 由来のカロチノイド合成遺伝子群と本発明DNA鎖（典型的には、Agrobacterium aurant

iacus sp. nov. MK1 または Alcaligenes sp. PC-1 由来のカロチノイド合成遺伝子群) を組み合わせて同一の微生物に同時に導入することにより、原理的には、遺伝子導入発現系が確立しているすべての微生物に、アスタキサンチン等のケトカロチノイドを生産させることが可能となるはずである。以下に、各種ケトカロチノイドの微生物による生産法について説明する。

< カンタキサンチン、エキネノンの生産 >

β -カロチン合成に必要な Erwinia uredovora の crtE、crtB、crtI、crtY 遺伝子およびケト基導入酵素遺伝子である本発明 DNA 鎖 (1) ~ (9) のいずれか 1 項の DNA 鎖 (典型的には Agrobacterium aurantiacus sp. nov.

MK1 または Alcaligenes PC-1 の crtW 遺伝子) を大腸菌等の微生物に導入し発現させることにより、最終産物としてカンタキサンチン、中間代謝産物としてエキネノンを生産させることができる。上記 DNA 鎖 (crtW 遺伝子) の発現レベルの調節やこれを有する微生物の培養条件の検討等により、カンタキサンチンやエキネノンの収量や量比を変えることができる。以下に大腸菌における 2 つの例を述べるが、詳細は実施例を参照されたい。

Erwinia uredovora の crtE、crtB、crtI、crtY 遺伝子を含む断片を大腸菌ベクター pACYC184 に挿入したプラスミド pACCAR16 Δ crtX、および、Ag. aurantiacus sp. nov. MK1 の crtW 遺伝子を含む断片を大腸菌ベク

ター pBluescript II SK- に挿入したプラスミド pAK916 の両プラスミドを大腸菌 JM101 に導入し、それを定常期まで培養し、菌体を集め、カロチノイド色素を抽出した。抽出された色素の 94% はカンタキサンチンであり、6 % はエキネノンであった。また、カンタキサンチンの収量は、培養液 2 リットルから 3 mg であった。

Erwinia uredovora の crtE、crtB、crtI、crtY 遺伝子を含む断片を大腸菌ベクター pACYC184 に挿入したプラスミド pACCAR16 Δ crtX、および、Alcaligenes PC-1 の crtW 遺伝子を含む断片を大腸菌ベクター pBluescript II SK+ に挿入したプラスミド pPC17-3 の両プラスミドを大腸菌 JM101 に導入し、それを定常期まで培養し、菌体を集め、カロチノイド色素を抽出した。抽出された色素の 40% はカンタキサンチンであり、50% はエキネノンであった。残りの 10% は未反応の β -カロチンであった。

< アスタキサンチン、4-ケトゼアキサンチンの生産 >

ゼアキサンチン合成に必要な Erwinia uredovora の crtE、crtB、crtI、crtY、crtZ 遺伝子およびケト基導入酵素遺伝子である本発明 DNA 鎖 (10) ~ (18) のいずれか 1 項の DNA 鎖 (典型的には Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1 または Alcaligenes PC-1 の crtW 遺伝子) を大腸菌等の微生物に導入し発現させることにより、最終産物としてアスタキサンチン、中間代謝産物と

して 4 - ケトゼアキサンチンを生産させることができる。
上記 DNA 鎖 (crtW 遺伝子) の発現レベルの調節やこれを有する微生物の培養条件の検討等により、アスタキサンチンや 4 - ケトゼアキサンチンの収量や量比を変えることができる。ただし、
以下に大腸菌における 2 つの例を述べるが、詳細は実施例を参照されたい。

Erwinia uredovora の crtE、crtB、crtI、crtY、crtZ 遺伝子を含む断片を大腸菌ベクター pACYC184 に挿入したプラスミド pACCAR25 Δ crtX、および、Ag. aurantiacus sp. nov. MK1 の crtW 遺伝子を含む断片を大腸菌ベクター pBluescript II SK- に挿入したプラスミド pAK916 の両プラスミドを大腸菌 JM101 に導入し、それを定常期まで培養し、菌体を集め、カロチノイド色素を抽出した。抽出された色素のうち、アスタキサンチンと 4 - ケトゼアキサンチンの収量は、それぞれ、培養液 2 リットルから 1.7 mg、1.5 mg であった。

Erwinia uredovora の crtE、crtB、crtI、crtY、crtZ 遺伝子を含む断片を大腸菌ベクター pACYC184 に挿入したプラスミド pACCAR25 Δ crtX、および、Alcaligenes PC-1 の crtW 遺伝子を含む断片を大腸菌ベクター pBluescript II SK+ に挿入したプラスミド pPC17-3 の両プラスミドを大腸菌 JM101 に導入し、それを定常期まで培養し、菌体を集め、カロチノイド色素を抽出した。抽

出された色素のうち、アスタキサンチンと4-ケトゼアキサンチンの収量は、それぞれ、培養液2リットルから約1mgであった。

＜アスタキサンチン、フェニコキサンチンの生産＞

β -カロチン合成に必要な Erwinia uredovora の crtE、crtB、crtI、crtY 遺伝子および ケト基導入酵素遺伝子である本発明DNA鎖(1)～(9)のいずれか1項のDNA鎖(典型的には Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1または Alcaligenes PC-1 の crtW 遺伝子)と水酸基導入酵素遺伝子である本発明DNA鎖(19)～(27)のいずれか1項のDNA鎖(典型的には Ag. aurantiacus sp. nov. MK1または Alcaligenes PC-1 の crtZ 遺伝子)を大腸菌等の微生物に導入し発現させることにより、最終産物としてアスタキサンチン、中間代謝産物としてフェニコキサンチンを生産させることができる。上記DNA鎖(crtW 遺伝子および crtZ 遺伝子)の発現レベルの調節やこれを有する微生物の培養条件の検討等により、アスタキサンチン、フェニコキサンチンの収量や量比を変えることができる。以下に大腸菌における1例を述べるが、詳細は実施例を参照されたい。

Erwinia uredovora の crtE、crtB、crtI、crtY 遺伝子を含む断片を大腸菌ベクター pACYC184 に挿入したプラスミド pACCAR16 Δ crtX、および、Ag. aurantiacus sp. nov. MK1 の crtW、crtZ 遺伝子を含む断片を大

腸菌ベクター pBluescript II SK- に挿入したプラスミド pAK96K の両プラスミドを大腸菌 JM101に導入し、それを定常期まで培養し、菌体を集め、カロチノイド色素を抽出した。抽出された色素のうち、アスタキサンチンとフェニコキサンチンの収量は、それぞれ、培養液 4 リットルから 3 mg、2 mgであった。

微生物の寄託

本発明 DNA 鎖の遺伝子源となった微生物および単離された遺伝子を組み込んだ大腸菌は、工業技術院生命工学工業技術研究所に下記の通りに寄託されている。

(i) Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1

寄託番号 : FERM BP-4506

受託年月日 : 平成 5 年 12 月 20 日

(ii) Escherichia coli JM101 (pAccrt-E1B, pAK92)

寄託番号 : FERM BP-4505

受託年月日 : 平成 5 年 12 月 20 日

(iii) Alcaligenes sp. PC-1

寄託番号 : FERM BP-4760

受託年月日 : 平成 6 年 7 月 27 日

(iv) Escherichia coli. β : pPC17

寄託番号 : FERM BP-4761

受託年月日 : 平成 6 年 7 月 27 日

例

以下の実施例は、本発明をさらに具体的に説明するた

めのものであり、本発明を限定するものではない。なお、ここで用いられた通常の遺伝子組換え実験は、特に言及されていない場合は、標準的な方法 (Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 'Molecular cloning - A laboratory manual,' Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に基づいている。

実施例 1 : 染色体 DNA の調製

染色体 DNA は、3 種の海洋細菌、すなわち、Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1、Alcaligenes sp. PC-1、及び Alteromonas SD-402 株 (Yokoyama, A., Izumida, H., Miki, W., 'Marine bacteria produced astaxanthin', 10th International symposium on carotenoids, abstract, CL11-3, 1993) から調製した。これらの海洋細菌を 200 ミリリットル (ml) の培地 (DIFCO 社製 "Marine Broth" を説明書記載の方法により調製した培地) で、25℃、定常期まで 4 日間増殖させた菌体を集菌後、TES 緩衝液 (20 mM トリス、10 mM EDTA、0.1 M NaCl、pH8) で洗浄し、68℃で15分間熱処理した後、5 mg/ml リゾチーム (生化学工業製) と 100 µg/ml RNase A (シグマ社製) を含む I 液 (50 mM グルコース、25 mM トリス、10 mM EDTA, pH8) に懸濁した。37℃で1時間インキュベートした後、250 µg/ml になるようにプロテイナーゼ K (Proteinase K、ベーリンガー・マンハイム製) を加え、37℃で10分間インキュベ-

トした。さらに、最終濃度が1%になるようにザルコシール (N-Lauroylsarcosine Na、シグマ社製) を加え、よく混合した後、37℃で数時間インキュベートした。さらに、フェノール/クロロホルム抽出を数回行った後、2倍量のエタノールをゆっくり加えながら、析出してきた染色体DNAをガラス棒に巻き付け、70%エタノールでリンスした後、2 ml のTE 緩衝液 (10 mM トリス、1 mM EDTA、pH8) に溶解して、染色体DNA調製液とした。

実施例 2 : コスミドライブラリーのための宿主の作製

(1) フィトエン産生大腸菌の作製

Erwinia uredovora の crtZ 以外のカロチノイド合成遺伝子群を有するプラスミド pCAR16 (Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K., Harashima K., 'Elucidation of the Erwinia uredovora carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in Escherichia coli'. J. Bacteriol., 172, p.6704-6712, 1990、および、本発明者らによる特許出願特願平3-58786号公報 (特願平2-53255号明細書) : 「カロチノイドの合成に有用なDNA鎖」) から BstEII (1235) - Eco 521 (4926) 断片を除いた後、フィトエン産生に必要な crtE と crtB 遺伝子を含む 2.3 キロ塩基対 (kb) の Asp 718 (KpnI) - EcoRI 断片を切りだした。そして、この断片を大腸菌ベクター pACYC184 の EcoRV 部

位に挿入し、目的とするプラスミド (pACCRT-EB) を得た。この pACCRT-EBを有する大腸菌は、抗生物質クロラムフェニコール耐性 (Cm^r) を示し、フィトエンを生産する (Linden, H., Misawa, N., Chamovitz, D., Peckert, I., Hirschberg, J., Sandmann, G., 'Functional complementation in Escherichia coli of different phytoene desaturase genes and analysis of accumulated carotenes'. Z. Naturforsch., 46c, 1045-1051, 1991)。

(2) リコピン産生大腸菌の作製

Er. uredovora の crtZ 以外のカロチノイド合成遺伝子群を有するプラスミド pCAR16 から BstEII (1235) - SnaBI (3497) 断片を除いた後、リコピン産生に必要な crtE、crtI、crtB 遺伝子を含む 3.75 kb Asp718 (KpnI) - EcoRI 断片を切りだした。そして、この断片を大腸菌ベクター pACYC184 の EcoRV部位に挿入し、目的とするプラスミド (pACCRT-EIB) を得た。この pACCRT-EIB を有する大腸菌は、 Cm^r を示し、リコピンを生産する (Cunningham Jr, F. X., Chamovitz, D., Misawa, N., Gatt, E., Hirschberg, J., 'Cloning and functional expression in Escherichia coli of a cyanobacterial gene for lycopene cyclase, the enzyme that catalyzes the biosynthesis of β -carotene'. FEBS Lett., 328, 130-138, 1993)。

(3) β -カロチン産生大腸菌の作製

Er. uredovora の crtZ 以外のカロチノイド合成遺伝子群を有するプラスミド pCAR16 の制限酵素 BstEII 消化、Klenow fragment 処理、ライゲーション反応を行うことにより、crtX 遺伝子をフレームシフトにより失活させた後、 β -カロチン産生に必要な crtE、crtY、crtI、crtB 遺伝子を含む 6.0 kb Asp718 (KpnI) - EcoRI 断片を切りだした。そして、この断片を大腸菌ベクター pACYC184 の EcoRV 部位に挿入し、目的とするプラスミド (pACCAR16 Δ crtX と命名) を得た。この pACCAR16 Δ crtX を有する大腸菌は、 Cm^r を示し、 β -カロチンを生産する。なお、制限酵素および遺伝子操作に用いる酵素類は、宝酒造 (株) またはベーリンガー・マンハイム社から購入した。

実施例 3 : コスミドライブラリーの作製および橙色を呈する大腸菌の取得

Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1 の染色体 DNA 25 μ g に対して、1 ユニットの制限酵素 Sau3AI を用い、37℃、15 分間インキュベートした後、68℃、10 分間の処理で制限酵素を失活させた。この条件で、40 kb 付近に多くの Sau3AI 部分分解断片が得られた。この一部を用いて、コスミドベクター pJB8 (アンピシリン耐性 (Ap^r)) を BamHI 消化後アルカリフォスファターゼ処理したもの、および、pJB8 を Sall / BamHI

消化後右アーム（小さい方の断片）をゲルから回収したものを混ぜ、12℃、一晚ライゲーション反応を行った。なお、pJB8 は以前にアマーシャム社から購入したものである。

上記のライゲーション反応を行ったDNAを用い、ギガパック・ゴールド（ストラタジーン社製、フナコシ販売）により in vitro パッケージングを行い、コスミドライブラリーを作るのに十分量のファージ粒子を得た。

このファージ粒子を大腸菌（Escherichia coli）DH1（ATCC33849）、および、実施例2で作製した3種のプラスミドの各々を有する大腸菌 DH1 に感染させた後、1プレートあたり100 - 300 コロニーになるように希釈し、適当な薬剤を含むLB（1%トリプトン、0.5%イーストエキス、1% NaCl）にプレーティングし、37℃または室温で、一晚から数日間培養した。

その結果、ただの大腸菌（ベージュ色）および pACCR T-EB を有するフィトエン産生大腸菌（ベージュ色）を宿主としたコスミドライブラリーでは、各々、1万コロニー以上スクリーニングしたが、色調が変化したものは得られなかった。一方、pACCRT-EIB を有するリコピン産生大腸菌（うすい赤色）および pACCAR16 $\Delta crtX$ を有する β -カロチン産生大腸菌（黄色）を宿主としたコスミドライブラリーでは、各々、数百コロニーに1株の割合で、橙色を呈するコロニーが出現した。これらの橙色

を呈する大腸菌形質転換株のほとんどは、pJB8 に 40 kb 前後の Sau3AI 部分分解断片が挿入されたプラスミドを含んでいた。なお、ただの大腸菌および pACCRT-EB を有するフィトエン産生大腸菌を宿主としたコスミドライブラリーでは色調が変化したものは得られなかったことから、Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1 染色体 DNA からキサントフィル合成遺伝子群を発現クローニングするためには、少なくともフィトエンより後のカロチノイド合成中間体を作る大腸菌を宿主として用いなければならないことがわかる。

実施例 4：橙色色素合成遺伝子群を含む断片の縮小化

pACCRT-E1B を有するリコピン産生大腸菌 DH1（うすい赤色）および pACCAR16 $\Delta crtX$ を有する β -カロチン産生大腸菌 DH1（黄色）を宿主としたコスミドライブラリーで得られた橙色のコロニーの中から、各々、数十コロニーを選んで、そのプラスミドを分析したところ、1 株を除いてすべて、pJB8 に 33 kb から 47 kb の Sau3AI 部分分解断片が挿入されたプラスミドが含まれていた。残りの 1 株（リコピン産生大腸菌を宿主としたもの）には、pJB8 に 3.9 kb の Sau3AI 部分分解断片が挿入されたプラスミド（pAK9 と命名）が含まれていた。これは、大腸菌に感染後、挿入断片の in vivo デレージョンにより形成されたものであると考えられた。pAK9 を有するリコピン産生大腸菌は、その他のコスミドライ

ブラリーから得られた橙色コロニーと同一の色素（実施例 6 においてアスタキサンチンと同定）を合成することができたので、以後の解析には、この pAK9 を材料として用いた。

実施例 5 : 橙色色素合成遺伝子群の塩基配列決定

pAK9 から調製した 3.9 kb の EcoRI 挿入断片を大腸菌ベクター pBluescript II SK+ の EcoRI 部位に挿入して、断片の方向性がベクターに対して互いに逆の 2 種のプラスミド（pAK91 および pAK92 と命名）を得た。このうちプラスミド pAK92 の制限酵素地図を第 12 図に示す。pAK92 をリコピン産生大腸菌に導入したところ、アスタキサンチン合成（実施例 6）により橙色コロニーになったが、pAK91 をリコピン産生大腸菌に導入しても、新たな色素の合成能は与えられなかった。したがって、プラスミド pAK92 における色素合成遺伝子群の方向性はベクターの lac プロモーターの向きと同じであると考えられた。つぎに pAK91 の PstI 分解により得られる 2.7 kb の PstI 断片と、pAK92 から BamHI 分解により得られる 2.9 kb の BamHI 断片および SalI 分解により得られる 2.3 kb と 1.6 kb との SalI 断片とを、それぞれベクター pBluescript II SK- にクローニングした。これにより得られたプラスミドのうち、pAK94、pAK96、pAK98、pAK910、pAK93、pAK95 と名付けたプラスミドの制限酵素地図を第 12 図に示す。プラスミド pAK94、pAK96、pAK98、

pAK910は色素合成遺伝子群の方向性がベクターの lac プロモーターの向きと同じであり、pAK93、pAK95では逆である。

2.9 kbの BamHI 断片を有するプラスミド pAK96 をリコピン産生大腸菌に導入しても、3.9 kb EcoRI 断片を有する pAK92を導入した場合と同様に、その大腸菌形質転換株はアスタキサンチンを合成することがわかったため（実施例6）、この2.9 kb BamHI断片のDNA配列の決定を行った。

DNA配列の決定は2.9 kbの BamHI 断片について正逆両方向からの欠失変異体を作成し、得られた種々の長さの欠失を有するクローンについて行った。欠失変異体作製は4種のプラスミド pAK96、pAK98、pAK93、pAK95について以下の手順で行った。それぞれのプラスミド、10 μ g を SacI と XbaI とで分解した後、フェノール／クロロホルム抽出を行い、エタノール沈殿によりDNAを回収した。それぞれのDNAを100 μ l の ExoIIIバッファ（50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM 2-メルカプトエタノール, pH8.0）に溶解し、180ユニットの ExoIIIヌクレアーゼを加えて37℃で保温した。1分ごとに10 μ l をサンプリングして、2サンプル分ずつ、20 μ l の MBバッファ（40 mM Na-Acetate, 100 mM NaCl, 2 mM ZnCl₂, 10 % グリセロール, pH4.5）の入った氷上のチューブに移した。サンプリング終了後、得

られた5本のチューブを65℃、10分間保温して酵素を失活させた後、5ユニットのマンガビーンヌクレアーゼを加えて37℃で30分間保温した。反応後、アガロースゲル電気泳動により、1つのプラスミドについて5種のそれぞれ欠失の程度が異なるDNA断片を回収した。回収したDNAはKlenow fragmentにより末端を平滑化し、16℃、一晩ライゲーション反応した後、大腸菌JM109を形質転換した。得られた種々のクローンについてヘルパーファージM13K07を用いて1本鎖DNAを調製し、アプライドバイオシステム(株)の蛍光プライマーサイクルシーケンスキットを用いてシーケンス反応を行い、自動シーケンサーを用いてDNA配列を決定した。

その結果得られた2886塩基対(bp)からなるDNA配列を第5～9図(配列番号4)に示す。開始コドンの前にリボソーム結合部位が存在するオープン・リーディング・フレームの検索の結果、3種のキサントフィル合成遺伝子crtW、crtZ、crtYの存在が予想された位置(実施例8)に各々のタンパク質をコードしうる3つのオープンリーディングフレーム(第5～9図中AからB(配列番号4の塩基位置229～864)、CからD(塩基位置864～1349)、EからF(塩基位置1349～2506))が見いだされた。このうちAからB、EからFの2つのオープンリーディングフレームについてはそれぞれ開始コドンはGTGであり、CからDについてはATGである。

実施例 6 : 橙色色素の同定

pAK92 または pAK96 をリコピン産生大腸菌 JM101 に導入したもの（大腸菌 (pACCRT-E1B、pAK92 または pAK96)）（橙色を呈している）、または、pAK94 または pAK96K（第 12 図）を β -カロチン産生大腸菌 JM101 に導入したもの（大腸菌 (pACCAR16 Δ crtX, pAK94 または pAK96K)）（橙色を呈している）を 150 μ g/ml のアンピシリン (Ap、明治製菓製) と 30 μ g/ml のクロラムフェニコール (Cm、三共製) を含む 2YT 培地 (1.6 % トリプトン、1 % イーストエキス、0.5 % NaCl) 4 リットルで、37℃、18 時間培養した。培養液から集菌した菌体を、600 ml のアセトンにより抽出した。これを濃縮後、400 ml のクロロホルム/メタノール (9/1) で 2 回抽出し、濃縮乾固した。さらに、これを少量のクロロホルム/メタノール (9/1) に溶解後、メルク社製の分取用シリカゲル TLC プレートを用いて、クロロホルム/メタノール (15/1) で展開することにより、薄層クロマトグラフィー (TLC) を行った。元の橙色色素は、この TLC により、Rf 値 0.72、0.82、0.91 の 3 スポットに分かれた。橙色色素全体の 50% に相当する、最も濃い Rf 0.72 の色素と、次に濃い Rf 0.82 の色素を、TLC プレートから、かきとり後、少量のクロロホルム/メタノール (9/1) またはメタノールに溶解し、セファデクス LH-20 カラムクロマトグラフィー (15 X 300 mm)

にかけ、クロロホルム／メタノール（9／1）またはメタノールで展開溶出することにより、各々の純品を、3 mg（：Rf 0.72）、2 mg（：Rf 0.82）得た。

Rf 0.72 の色素は、紫外－可視スペクトル、¹H-NMR、FD-MS スペクトル（m/e 596）の結果より、アスタキサンチンと同一の平面構造を持つものであることが明らかになった。そこで、ジエチルエーテル：2-プロパノール：エタノール 5：5：2 に溶解し、CDスペクトルを測定したところ、3S, 3'S の立体構造をとることがわかったため、本物質をアスタキサンチン（astaxanthin、構造式は第11図参照）と同定した。また、Rf 0.82 の色素は、紫外－可視スペクトル、¹H-NMR、FD-MS スペクトル（m/e 580）の結果より、フェニコキサンチン（phenicoxanthin、構造式は第11図参照）と同定された。なお、Rf 0.91 の色素はカンタキサンチンであった（実施例7(2)）。

実施例7：キサントフィル中間代謝産物の同定

(1) 4-ケトゼアキサンチンの同定

ゼアキサンチン産生大腸菌は次のようにして作製された。すなわち、Er. uredovora の全カロチノイド合成遺伝子群を有するプラスミド pCAR25（Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K., Harashima K., 'Elucidation of the Erwinia uredovora carotenoid biosynthetic pathway b

y functional analysis of gene products expressed in Escherichia coli'. J. Bacteriol., 172, p.6704-6712, 1990、および、本発明者らによる特許出願特願平3-58786号公報（特願平2-53255号明細書）：「カロチノイドの合成に有用なDNA鎖」の制限酵素 BstEII 消化、Klenow fragment 処理、ライゲーション反応を行うことにより、crtX 遺伝子をフレームシフトにより失活させた後、ゼアキサンチン産生に必要な crtE、crtY、crtI、crtB、crtZ 遺伝子を含む6.5 kb Asp718 (KpnI) - EcoRI 断片を切りだした。そして、この断片を大腸菌ベクター pACYC184 の EcoRV 部位に挿入し、目的とするプラスミド (pACCAR25ΔcrtXと命名) を得た。

pAK910またはpAK916（第12図）をこのゼアキサンチン産生大腸菌JM101に導入したもの（大腸菌（pACCAR25ΔcrtX、pAK910またはpAK916））（橙色を呈している）を150 μg/mlのApと30 μg/mlのCmを含む2YT培地2リットルで、37℃、18時間培養した。培養液から集菌した菌体を、300 mlのアセトンにより抽出した。これを濃縮後、200 mlのクロロホルム／メタノール（9／1）で2回抽出し、濃縮乾固した。さらに、これを少量のクロロホルム／メタノール（9／1）に溶解後、メルク社製の分取用シリカゲルTLCプレートを用いて、クロロホルム／メタノール（15／1）で展開することにより、薄層クロマトグラフィー（TLC）を行った。元の橙

色色素は、このTLCにより、R_f 値 0.54 (46%)、0.72 (53%)、0.91 (1%) の3スポットに分かれた。R_f 0.54の色素を、TLCプレートから、かきとり後、少量のクロロホルム／メタノール(9／1)またはメタノールに溶解し、セファデクス LH-20 カラムクロマトグラフィー(15 X 300 mm)にかけ、クロロホルム／メタノール(9／1)またはメタノールで展開溶出することにより、純品を 1.5 mg 得た。

本物質における紫外-可視スペクトル、FD-MS スペクトル(m/e 582)、および、シリカゲルTLCの移動度(クロロホルム／メタノール(15／1)で展開)が、4-ケトゼアキサンチンの標準品(Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1 より精製、特願平5-70335)とすべて一致したため、本物質を4-ケトゼアキサンチン(4-ketozeaxanthin、構造式は第11図参照)と同定した。なお、R_f 0.72 および R_f 0.91 の色素はそれぞれ、アスタキサンチン(実施例6)、カンタキサンチン(実施例7(2))である。

(2) カンタキサンチンの同定

pAK910またはpAK916をβ-カロチン産生大腸菌JM101に導入したもの(大腸菌(pACCAR16ΔcrtX、pAK910またはpAK916)) (橙色を呈している)を 150 μg/mlのApと30 μg/mlのCmを含む2YT培地2リットルで、37℃、18時間培養した。培養液から集菌した菌体を、300

ml のアセトンにより抽出した。これを濃縮後、200 ml のクロロホルム／メタノール（9／1）で2回抽出し、濃縮乾固した。さらに、これを少量のクロロホルム／メタノール（9／1）に溶解後、メルク社製の分取用シリカゲルTLCプレートを用いて、クロロホルム／メタノール（50／1）で展開することにより、薄層クロマトグラフィー（TLC）を行った。橙色色素全体の94％に相当する最も濃い色素を、TLCプレートから、ときとった。さらに少量のクロロホルム／メタノール（9／1）またはクロロホルム／メタノール（1/1）に溶解後、セファデックスLH-20カラムクロマトグラフィー（15 X 300 mm）にかけ、クロロホルム／メタノール（9／1）またはクロロホルム／メタノール（1/1）で展開溶出することにより、純品を3 mg 得た。

本物質における紫外－可視スペクトル、¹H-NMR、FD-MS スペクトル（m/e 564）、および、シリカゲルTLCの移動度（クロロホルム／メタノール（50／1）での展開でR_f0.53）が、カンタキサンチンの標準品（BASF社製）とすべて一致したため、本物質をカンタキサンチン（canthaxanthin、構造式は第11図参照）と同定した。また、最初の抽出物に見られた橙色色素全体の6％に相当する色素は、紫外－可視スペクトル、シリカゲルTLCの移動度（クロロホルム／メタノール（50／1）での展開でR_f0.78）、および、ノバパックHR 6μ C18（3.9 X 30

0 mm) (ウォーターズ社製) を用いた HPLC の移動度 (アセトニトリル/メタノール/2-プロパノール (90/6/4) で 1.0 ml/min の速度での展開で RT16 分) よりエキネノン (echinenone、構造式は第 11 図参照) であると考えられた。

(3) ゼアキサンチンの同定

pAK96NK (第 12 図) を β -カロチン産生大腸菌 JM101 に導入したもの (大腸菌 (pACCAR16 Δ *crtX*, pAK96NK)) (黄色を呈している) を 150 μ g/ml の Ap と 30 μ g/ml の Cm を含む 2YT 培地 2 リットルで、37℃、18 時間培養した。培養液から集菌した菌体を、300 ml のアセトンにより抽出した。これを濃縮後、200 ml のクロロホルム/メタノール (9/1) で 2 回抽出し、濃縮乾固した。さらに、これを少量のクロロホルム/メタノール (9/1) に溶解後、メルク社製の分取用シリカゲル TLC プレートを用いて、クロロホルム/メタノール (9/1) で展開することにより、薄層クロマトグラフィー (TLC) を行った。黄色色素全体の 87% に相当する最も濃い色素を、TLC プレートから、かきとった。さらに少量のクロロホルム/メタノール (9/1) またはメタノールに溶解後、セファデクス LH-20 カラムクロマトグラフィー (15 X 300 mm) にかき、クロロホルム/メタノール (9/1) またはメタノールで展開溶出することにより、純品を 3 mg 得た。

本物質における紫外-可視スペクトル、 $^1\text{H-NMR}$ 、 FD-M S スペクトル (m/e 568)、および、シリカゲルTLCの移動度 (クロロホルム/メタノール (9/1) での展開で $R_f 0.59$) が、ゼアキサンチンの標準品 (BASF社製) とすべて一致したため、本物質はゼアキサンチンと同一の平面構造を持つものであることが明かになった。そこで、ジエチルエーテル:2-プロパノール:エタノール 5:5:2 に溶解し、CDスペクトルを測定したところ、 $3R, 3'R$ の立体構造をとることがわかったため、本物質をゼアキサンチン (zeaxanthin、構造式は第11図参照) と同定した。また、最初の抽出物に見られた黄色色素全体の13%に相当する色素は、紫外-可視スペクトル、シリカゲルTLCの移動度 (クロロホルム/メタノール (9/1) での展開で $R_f 0.80$)、および、ノバパックHR $6\mu\text{C}_{18}$ (3.9 X 300 mm) (ウォーターズ社製) を用いたHPLCの移動度 (アセトニトリル/メタノール/2-プロパノール (90/6/4) で 1.0ml/min の速度での展開で R_T 19分) より β -クリプトキサンチン (β -cryptoxanthin、構造式は第11図参照) であると考えられた。

(4) β -カロチンの同定

pAK98 をリコピン産生大腸菌 JM101 に導入したもの (大腸菌 (pACCRT-E1B、pAK98)) (黄色を呈している) を 150 $\mu\text{g/ml}$ の Ap と 30 $\mu\text{g/ml}$ の Cm を含む 2YT 培地 2 リットルで、 37°C 、18時間培養した。培養液から集

菌した菌体を、300 ml のアセトンにより抽出した。これを濃縮後、200 mlのヘキサンにより2回抽出した。さらに、ヘキサン層を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (15 X 300 mm) につけ、ヘキサン/酢酸エチル (50/1) で展開溶出することにより、純品を3 mg 得た。

本物質における紫外-可視スペクトル、FD-MS スペクトル (m/e 536)、および、ノバパックHR 6 μ C18 (3.9 X 300 mm) (ウォーターズ社製) を用いたHPLCの移動度 (アセトニトリル/メタノール/2-プロパノール (90/6/4) で 1.0 ml/min の速度でRT62分) が、 β -カロチンの標準品 (オールトランス型、シグマ社製) とすべて一致したため、本物質を β -カロチン (β -carotene、構造式は第11図参照) と同定した。

実施例 8 : キサントフィル合成遺伝子群の同定

(1) ケト基導入酵素遺伝子の同定

pAK9 (実施例 4) または pAK92 に含まれる 3.9 kb の断片のうち、リコピンからアスタキサンチンの合成に必要なすべての遺伝子は、右側の 2.9 kb BamHI断片 (pAK96、第12図) の中に含まれていることが実施例 6 の結果より明かである。したがって、左側の 1.0 kb断片は必要ない。この pAK96 の 2.9 kb BamHI断片の中に1ヶ所の NcoI 部位と1ヶ所の KpnI 部位が存在する。この NcoI と KpnI 部位の間の 1.4 kb断片 (pAK96NK) には水酸基導

入酵素活性が存在し、ケト基導入酵素活性が存在しないことが実施例 7 (3) の結果よりわかる。また、2.9 kb BamHI断片の中に 1ヶ所存在し上記の NcoI と KpnI 部位の間にある SalI 部位さらにはこの SalI 部位より左の HincII 部位から 2.9 kb BamHI断片の右側の断片を除いた断片 (pAK910 および pAK916) においても、 β -カロチンからカンタキサンチンを合成できるが (実施例 7 (2)) 、pAK96 の 2.9 kb BamHI断片から HincII 部位よりさらに左の NcoI 部位から右側の断片を除いた断片においては β -カロチンからカンタキサンチンを合成する活性は消失していた。一方、pAK916 の 0.9 kb の BamHI - HincII 断片において、その中の左方に 1ヶ所存在する BglII 部位から左側の断片を除いても、上記の BamHI - HincII 断片 (pAK916) と同様の活性が存在した。したがって、pAK916 内の 0.74 kb の BglII - HincII 断片の中に β -カロチンを基質としてカンタキサンチンを合成する酵素活性を有するケト基導入酵素をコードする遺伝子が存在し、この遺伝子の中に上記の NcoI 部位が存在していると考えられる。塩基配列決定の結果、この遺伝子に相当する、開始コドンの直前にリボソーム結合部位を有する 1つのオープン・リーディング・フレームを検出することができたので、これを crtW 遺伝子と命名した。この crtW 遺伝子の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は第 1 図 (配列番号 1) に

示されている。

この Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1 の crtW 遺伝子産物 (CrtW) は、 β -イオノン環 (β -ionone ring) の 4 位のメチレン (methylene) 基をケト (keto) 基に転換する酵素活性を有しており、その具体的な例の 1 つが、 β -カロチン (β -carotene) を基質としてエキネノン (echinenone) を経てカンタキサンチン (cantaxanthin) を合成する酵素活性である (実施例 7 (2)、第 11 図参照)。さらに、crtW 遺伝子産物は、3-ヒドロキシ- β -イオノン環 (3-hydroxy- β -ionone ring) の 4 位のメチレン (methylene) 基をケト (keto) 基に転換する酵素活性も有しており、その具体的な例の 1 つが、ゼアキサンチン (zeaxanthin) を基質として 4-ケトゼアキサンチン (4-ketozeaxanthin) を経てアスタキサンチン (astaxanthin) を合成する酵素活性である (実施例 7 (1)、第 11 図参照)。なお、このような酵素活性を有するポリペプチドおよびこれをコードする DNA 鎖は、従来知られていなかったものであり、このポリペプチドまたはこれをコードする DNA 鎖は、現在までに知られているどのようなポリペプチドまたは DNA 鎖とも全体的なホモロジーは有していない。また、 β -イオノン環や 3-ヒドロキシ- β -イオノン環に限らず、1 つの酵素がメチレン基をいきなりケト基に変換するという知見は今まで無かったものである。

(2) 水酸基導入酵素遺伝子の同定

pAK96 の 2.9 kb BamHI断片の中に 1ヶ所の SalI 部位が存在する。この SalI 部位で 2.9 kb BamHI断片を 2つの断片に切断して切り出すと、2つの断片 (pAK910と pAK98) とともに、水酸基導入酵素活性は無くなってしまふ。すなわち、左側の断片 (pAK910) にはケト基導入酵素活性しか存在しなく (実施例 7 (2))、右側の断片 (pAK98) にはリコピン環化酵素活性しか存在しない (実施例 7 (4))。一方、上記の SalI 部位を含む 1.4 kbの NcoI - KpnI断片 (pAK96NK) を β -カロチン産生大腸菌に導入すると、 β -クリプトキサンチンを経て、ゼアキサンチンを合成するようになる (実施例 7 (3))。したがって、この 1.4 kbの NcoI - KpnI断片の中に β -カロチンを基質としてゼアキサンチンを合成する酵素活性を有する水酸基導入酵素をコードする遺伝子が存在し、この遺伝子の中に上記の SalI 部位が存在していると考えられる。塩基配列決定の結果、この遺伝子に相当する、開始コドンの直前にリボソーム結合部位を有する 1つのオープン・リーディング・フレームを検出することができたので、これを crtZ 遺伝子と命名した。この crtZ 遺伝子の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は第 2 図 (配列番号 2) に示されている。

この Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1の crt

2 遺伝子産物 (CrtZ) は、 β -イオノン環 (β -ionone ring) の 3 位の炭素に 1 つの水酸基を付加する酵素活性を有しており、その具体的な例の 1 つが、 β -カロチン (β -carotene) を基質として β -クリプトキサンチン (β -cryptoxanthin) を経てゼアキサンチン (zeaxanthin) を合成する酵素活性である (実施例 7 (3)、第 11 図参照)。さらに、crtZ 遺伝子産物は、4-ケト- β -イオノン環 (4-keto- β -ionone ring) の 3 位の炭素に 1 つの水酸基を付加する酵素活性も有しており、その具体的な例の 1 つが、カンタキサンチン (canthaxanthin) を基質としてフェニコキサンチン (phoenicoxanthin) を経てアスタキサンチン (astaxanthin) を合成する酵素活性である (実施例 6、第 11 図参照)。なお、後者の酵素活性を有するポリペプチドおよびこれをコードする DNA 鎖は、従来知られていなかったものである。また、Agrobacterium の CrtZ は、アミノ酸配列レベルで、Erwinia uredovora の CrtZ と 57% のアイデンティティーという意義深いホモロジーを示した。

(3) リコピン環化酵素遺伝子の同定

pAK96 において 2.9 kb BamHI断片内の右方にある KpnI部位から右側の断片を除いた断片 (pAK96K)、さらにはこの KpnI 部位より右にある PstI 部位から右側の断片を除いた断片 (pAK94) においては、 β -カロチンからアスタキサンチンは合成できるが (実施例 6)、リコピ

ンからはアスタキサンチンを合成することはできなくなる。一方、2.9 kb BamHI断片の中に1ヶ所存在し上記の KpnI 部位より左に存在する SalI 部位から右側の断片を含む1.6 kb SalI 断片 (pAK98) をリコピン産生大腸菌に導入すると、 β -カロチンを合成するようになる

(実施例7(4))。したがって、この1.6 kb SalI 断片の中にリコピンを基質として β -カロチンを合成する酵素活性を有するリコピン環化酵素をコードする遺伝子が存在し、この遺伝子は、上記の KpnI と PstI 部位にまたがって存在していると考えられる。塩基配列決定の結果、この遺伝子に相当する、開始コドンの直前にリボソーム結合部位を有する1つのオープン・リーディング・フレームを検出することができたので、これを crtY 遺伝子と命名した。この crtY 遺伝子の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は第3~4図(配列番号3)に示されている。

なお、この Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1 の crtY 遺伝子産物 (Crt Y) は、アミノ酸配列レベルで、Erwinia uredovora の CrtY と44.3%のアイデンティティーという意義深いホモロジーを有しており、酵素の機能も両者で同一である。

実施例9：他の海洋細菌の染色体DNAとのサザン分析

他の海洋微生物の染色体上に単離した crtW と crtZ と相同性を示す領域が得られるか否かを検討した。実施例1

で調製した Alcaligenes sp. PC-1 と Alteromonas sp. SD-402 の染色体 DNA を制限酵素 BamHI および PstI で消化し、アガロースゲル電気泳動法で分離した。全ての分離した DNA 断片を 0.5 N NaOH、1.5 M NaCl のアルカリ溶液で変性した後、一晩かけてナイロンメンブレンにトランスファーさせた。DNA が吸着したナイロンメンブレンをハイブリダイゼーション溶液 (6xDenhardt、5xSSC、100 μ g/ml ssDNA) に浸し、2 時間、60℃ でプレハイブリダイゼーションを行なった。次に、pAK96K から BalI で切り出した crtW と crtZ を含む 1.5 kb の DNA 断片を Mega primeTM DNA labelling systems (アマシャム) と [α -³²P]dCTP (~110TBq/mmol) とを用いて標識化し、上記のプレハイブリダイゼーション溶液に加えて 16 時間、60℃ でハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション後、2xSSC、0.1% SDS で 60℃、1 時間洗浄しオートラジオグラフィーによって相同性を示すシグナルを検出した結果、Alcaligenes sp. PC-1 では BamHI 消化物で約 13 kb、PstI 消化物で 2.35 kb の位置に強いシグナルが得られ、Alteromonas sp. SD-402 では BamHI 消化物で約 5.6 kb、PstI 消化物で 20 kb 以上の位置に強いシグナルが得られた。

実施例 10 : 他の海洋細菌よりのキサントフィル合成遺伝子群の取得

実施例 9 の結果より、Alcaligenes sp. PC-1 の染色体

DNA の PstI 消化物で、2.35 kb 付近に Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1 の crtW と crtZ 遺伝子を含む DNA 断片とハイブリダイズする領域が存在することがわかったので、Alcaligenes の染色体 DNA を PstI で消化した後、2 ~ 3.5 kb のサイズの DNA 断片をアガロースゲル電気泳動法により回収した。回収した DNA 断片をベクター pBluescript II SK+ の PstI 部位に T4 DNA リガーゼを用いて挿入し、大腸菌 DH5 α に導入して、Alcaligenes の部分ライブラリーを作製した。この部分ライブラリーを、Agrobacterium の crtW と crtZ 遺伝子を含む 1.5 kb の DNA 断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションに供した結果、約 5000 コロニーからポジティブなコロニーを 1 つ単離した。なお、コロニーハイブリダイゼーションの条件は、実施例 9 に示したサザン分析法と同条件で行った。続いて、得られたコロニーからプラスミド DNA を単離し、PstI で消化して、組込まれた DNA 断片のサイズを調べたところ、プラスミド中には 3 つの異なる断片が含まれていることがわかった。そこで、3 つの異なる DNA 断片の中から実施例 9 に示したサザン分析法でハイブリダイズする 2.35 kb 断片 1 つを特定し、アガロースゲル電気泳動法を用いてこの 2.35 kb PstI 断片を回収し、再度 pBluescript II SK+ の PstI 部位に挿入して、プラスミド pPC11、pPC12 を作製した。pPC11 と pPC12 においては、上記 2.35 kb PstI 断片が pBlues

cript II SK+の PstI 部位に互いに逆向きに挿入されたものである。pPC11 の制限酵素地図を第 19 図に示す。

実施例 11 : Alcaligenes キサントフィル合成遺伝子群の塩基配列決定

pPC11 及び pPC12 を β -カロチン産生大腸菌に導入したところ、前者はアスタキサンチン等の合成（実施例 12）により橙色コロニーになったが、後者は新たな色素の合成能を与えなかった。したがって、プラスミド pPC11 におけるアスタキサンチン合成遺伝子群の方向はベクター-lac プロモーターの向きと同じであると考えられた。また、pPC11 をリコピン産生大腸菌に導入しても、新たな色素は産生されなかったので、pPC11 にはリコピン環化酵素遺伝子は含まれていないことがわかった。

pPC11 の挿入断片のうち右側の 0.72 kb BstEII-EcoRV断片を脱落させたプラスミド（pPC17 と命名、第 19 図）を β -カロチン産生大腸菌に導入しても、pPC11 を導入した場合と同様に、その大腸菌形質転換体はアスタキサンチン等を合成することがわかったため（実施例 12）、この pPC17 における 1.63 kb PstI-BstEII断片の塩基配列の決定を行った。

欠失変異体作製は pPC17 と pPC12 を用いて、以下の手順で行った。pPC17 または pPC12、それぞれ 10 μ g を KpnI と HindIIIまたは KpnI と EcoRIとで分解した後、フェノール／クロロホルム抽出を行い、エタノール沈殿

により DNA を回収した。それぞれの DNA を 100 μ l の ExoIII バッファー (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM 2-メルカプトエタノール, pH8.0) に溶解し、180 ユニットの ExoIIIヌクレアーゼを加えて 37℃ で保温した。1 分ごとに 10 μ l をサンプリングして、2 サンプル分ずつ、20 μ l の MB バッファー (40 mM Na-Acetate, 100 mM NaCl, 2 mM ZnCl₂, 10 % グリセロール, pH4.5) の入った氷上のチューブに移した。サンプリング終了後、得られた 5 本のチューブを 65℃、10 分間保温して酵素を失活させた後、5 ユニットの マングビーンヌクレアーゼを加えて 37℃ で 30 分間保温した。反応後、アガロースゲル電気泳動により、1 つのプラスミドについて 10 種のそれぞれ欠失の程度が異なる DNA 断片を回収した。回収した DNA は Klenow fragment により末端を平滑化し、16℃、一晚ライゲーション反応した後、大腸菌 JM109 を形質転換した。得られた種々のクローンについてヘルパーファージ M13K07 を用いて 1 本鎖 DNA を調製し、アプライドバイオシステム (株) の蛍光プライマーサイクルシーケンスキットを用いてシーケンス反応を行い、自動シーケンサーを用いて DNA 配列を決定した。

その結果得られた 1631 塩基対 (bp) からなる DNA 配列を第 16 ~ 18 図 (配列番号 7) に示す。開始コドンの前にリボソーム結合部位が存在するオープン・リーディング・フレームの検索の結果、2 種のキサントフィル合

成遺伝子 crtW、crtZ の存在が予想された位置（実施例 13）に各々のタンパク質をコードしうる 2 つのオープンリーディングフレーム（第 16～18 図中 A から B（配列番号 7 の塩基位置 99～824）、C から D（塩基位置 824～1309）が見出された。

実施例 12 : *Alcaligenes* キサントフィル合成遺伝子群を有する大腸菌が生産する色素の同定

（1）アスタキサンチン、4-ケトゼアキサンチンの同定

実施例 11 で作製した pPC17 のデレーションプラスミドのうち、右側の BstEII 末端から第 17 図の塩基番号 1162（配列番号 7 の塩基位置 1162）まで欠失したデレーションプラスミド（crtW のみを有する）を pPC17-3（第 19 図）と名付けた。

この pPC17-3 をゼアキサンチン産生大腸菌 JM101（実施例 7 (1)）に導入したもの（大腸菌（pACCAR25Δ crtX、pPC17-3））（橙色を呈している）を 150 μ g / ml の Ap と 30 μ g / ml の Cm を含む 2YT 培地 2 リットルで、37℃、18 時間培養した。培養液から集菌した菌体を、300 ml のアセトンにより抽出した。これを濃縮後、200 ml のクロロホルム／メタノール（9 / 1）で 2 回抽出し、濃縮乾固した。さらに、これを少量のクロロホルム／メタノール（9 / 1）に溶解後、メルク社製の分取用シリカゲル TLC プレートを用いて、クロロホルム／メタノール

(15/1) で展開することにより、薄層クロマトグラフィー (TLC) を行った。元の橙色色素は、この TLC により、 R_f 値 0.54 (約 25%)、0.72 (約 30%)、0.91 (約 25%) の 3 スポットに分かれた。 R_f 値 0.54 と 0.72 の色素を、TLC プレートから、かきとり後、少量のクロロホルム/メタノール (9/1) またはメタノールに溶解し、セファデクス LH-20 カラムクロマトグラフィー (15 X 300 mm) にかけて、クロロホルム/メタノール (9/1) またはメタノールで展開溶出することにより、各々の純品を約 1 mg ずつ得た。

これらの物質における紫外-可視スペクトル、FD-MS スペクトル、および、シリカゲル TLC の移動度 (クロロホルム/メタノール (15/1) で展開) が、4-ケトゼアキサンチン、及び、アスタキサンチンの標準品 (実施例 6、7 (1)) とすべて一致したため、これらの物質を 4-ケトゼアキサンチン (R_f 0.54)、及び、アスタキサンチン (R_f 0.72) と同定した。なお、 R_f 値 0.91 の色素はカンタキサンチンであった (実施例 12 (2))。

また、pPC11 または pPC17 を β -カロチン産生大腸菌 JM101 に導入したもの (大腸菌 (pACCAR16 Δ crtX、pPC11 または pPC17)) (橙色を呈している) もアスタキサンチン、4-ケトゼアキサンチン及びカンタキサンチンを産生することが同様の分析により確認された。さらに、これらは、微量のフェニコキサンチンを生産することが

実施例 6 で得られた標品を用いて確認された。

(2) カンタキサンチンの同定

pPC17-3 を β -カロチン産生大腸菌 JM101 に導入したもの（大腸菌 (pACCAR16 Δ crtX、pPC17-3)）（橙色を呈している）を 150 μ g / ml の Ap と 30 μ g / ml の Cm を含む 2YT 培地 2 リットルで、37℃、18時間培養した。培養液から集菌した菌体を、300 ml のアセトンにより抽出した。これを濃縮後、200 ml のクロロホルム／メタノール（9 / 1）で2回抽出し、濃縮乾固した。さらに、これを少量のクロロホルム／メタノール（9 / 1）に溶解後、メルク社製の分取用シリカゲル TLC プレートを用いて、クロロホルム／メタノール（50 / 1）で展開することにより、薄層クロマトグラフィー（TLC）を行った。橙色色素全体の40%に相当する最も濃い色素を、TLC プレートから、かきとった。さらに少量のクロロホルム／メタノール（9 / 1）またはクロロホルム／メタノール（1/1）に溶解後、セファデクス LH-20 カラムクロマトグラフィー（15 X 300 mm）にかけ、クロロホルム／メタノール（9 / 1）またはクロロホルム／メタノール（1/1）で展開溶出することにより、純品を2 mg 得た。

本物質における紫外－可視スペクトル、FD-MS スペクトル（ m/e 564）、および、シリカゲル TLC の移動度（クロロホルム／メタノール（50 / 1）で展開）が、カンタキサンチンの標準品（BASF社製）とすべて一致した

ため、本物質をカンタキサンチンと同定した。また、最初の抽出物に見られた橙色色素全体の50%に相当する色素は、紫外-可視スペクトル、シリカゲルTLCの移動度（クロロホルム／メタノール（50／1）で展開）、および、ノバパックHR 6 μ C18（3.9 X 300 mm）（ウォーターズ社製）を用いたHPLCの移動度（アセトニトリル／メタノール／2-プロパノール（90／6／4）で展開）（実施例7（2）参照）よりエキネノンであると考えられた。なお、抽出された色素の残りの10%は未反応の β -カロチンであった。

（3）ゼアキサンチンの同定

pPC11における1.15 kb Sall断片をpPC11と同じ方向にpBluescript II SK+のSall部位に挿入したプラスミド（pPC13と命名、第19図参照）を作製した。

このpPC13を β -カロチン産生大腸菌JM101に導入したもの（大腸菌（pACCAR16 Δ crtX、pPC13））（黄色を呈している）を150 μ g / mlのApと30 μ g / mlのCmを含む2YT培地2リットルで、37℃、18時間培養した。培養液から集菌した菌体を、300 mlのアセトンにより抽出した。これを濃縮後、200 mlのクロロホルム／メタノール（9／1）で2回抽出し、濃縮乾固した。さらに、これを少量のクロロホルム／メタノール（9／1）に溶解後、メルク社製の分取用シリカゲルTLCプレートを用いて、クロロホルム／メタノール（9／1）で展開する

ことにより、薄層クロマトグラフィー (TLC) を行った。黄色色素全体の 90% に相当する最も濃い色素を、TLC プレートから、かきとった。さらに少量のクロロホルム／メタノール (9 / 1) またはメタノールに溶解後、セファデクス LH-20 カラムクロマトグラフィー (15 X 300 mm) にかき、クロロホルム／メタノール (9 / 1) またはメタノールで展開溶出することにより、純品を 3 mg 得た。

本物質における紫外-可視スペクトル、FD-MS スペクトル (m/e 568)、および、シリカゲル TLC の移動度 (クロロホルム／メタノール (9 / 1) で展開) が、ゼアキサンチンの標準品 (実施例 7 (3)) とすべて一致したため、本物質をゼアキサンチンと同定した。また、最初の抽出物に見られた黄色色素全体の 10% に相当する色素は、紫外-可視スペクトル、シリカゲル TLC の移動度 (クロロホルム／メタノール (9 / 1) で展開)、および、ノバパック HR 6 μ C18 (3.9 X 300 mm) (ウォーターズ社製) を用いた HPLC の移動度 (アセトニトリル／メタノール／2-プロパノール (90 / 6 / 4) で展開) (実施例 7 (3) 参照) より β -クリプトキサンチンであると考えられた。

実施例 13 : *Alcaligenes* キサントフィル合成遺伝子群の同定

(1) ケト基導入酵素遺伝子の同定

pPC11 に含まれる 2.35 kb の PstI 断片のうち、 β -カロチンからアスタキサンチンの合成に必要なすべての遺伝子は、左側の 1.63 kb PstI-BstEII 断片 (pPC17、第 19 図) の中に含まれていることが実施例 11 及び 12 (1) の結果より明かである。したがって、右側の 0.72 kb BstEII-PstI 断片は必要ない。この pPC17 の 1.63 kb PstI-BstEII 断片の中に 1ヶ所の SmaI 部位と 1ヶ所の SalI 部位が存在する (第 19 図)。この SmaI および SalI 部位の左の 0.65 kb および 0.69 kb の断片を取り除くと、いずれもケト基導入酵素活性が無くなることは、これらのデレーションプラスミドを β -カロチン産生大腸菌に導入したものをを用いた色素分析により確認した。また、1.63 kb PstI-BstEII 断片の左側の 0.69 kb PstI-SalI 断片を pBluescript SK+ の PstI-SalI 部位に挿入したプラスミドはケト基導入酵素活性を持たないことは、このプラスミドを β -カロチン産生大腸菌に導入したものをを用いた色素分析により確認した。一方、右側の BstEII 末端から第 17 図の塩基番号 1162 (配列番号 7 の塩基位置 1162) まで欠失したデレーションプラスミド pPC17-3 (第 19 図) にはケト基導入酵素活性が存在すること (実施例 12 (1)(2)) から、pPC17-3 内の 1162 bp 断片内に β -カロチンまたはゼアキサンチンを基質としてカンタキサンチンまたはアスタキサンチンを合成する酵素活性を有するケト基導入酵素

をコードする遺伝子が存在し、この遺伝子の中に上記の SmaI 部位と SalI 部位が存在していると考えられる。塩基配列決定の結果、この遺伝子に相当する、開始コードンの直前にリボソーム結合部位を有するオープン・リーディング・フレームを検出することができたので、これを crtW 遺伝子と命名した。この crtW 遺伝子の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は第 13 ~ 14 図（配列番号 5）に示されている。

この Alcaligenes sp. PC-1 の crtW 遺伝子産物 (CrtW) は、 β -イオノン環 (β -ionone ring) の 4 位のメチレン (methylene) 基をケト (keto) 基に転換する酵素活性を有しており、その具体的な例の 1 つが、 β -カロチン (β -carotene) を基質としてエキネノン (echinenone) を経てカンタキサンチン (canthaxanthin) を合成する酵素活性である（実施例 12 (2)、第 11 図参照）。さらに、crtW 遺伝子産物は、3-ヒドロキシ- β -イオノン環 (3-hydroxy- β -ionone ring) の 4 位のメチレン (methylene) 基をケト (keto) 基に転換する酵素活性も有しており、その具体的な例の 1 つが、ゼアキサンチン (zeaxanthin) を基質として 4-ケトゼアキサンチン (4-ketozeaxanthin) を経てアスタキサンチン (astaxanthin) を合成する酵素活性である（実施例 12 (1)、第 11 図参照）。なお、このような酵素活性を有するポリペプチドおよびこれをコードする DNA 鎖は、従来

知られていなかったものであり、このポリペプチドまたはこれをコードするDNA鎖は、現在までに知られているどのようなポリペプチドまたはDNA鎖とも全体的なホモロジーは有していない。なお、Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1と Alcaligenes sp. PC-1 間の crtW 遺伝子産物 (CrtW) は、アミノ酸配列レベルで 83 % のアイデンティティーという高いホモロジーを有しており、酵素の機能も両者で同一である。これらのアミノ酸配列の中で、アイデンティティーを有さない 17 % の領域のアミノ酸配列は、酵素の機能にそれほど重要ではないと考えられる。したがって、特に、この領域においては、少しくらい他のアミノ酸と置換、あるいは、欠失、または他のアミノ酸の付加を行っても酵素活性に影響は与えないと考えられる。

海洋細菌のケト基導入酵素遺伝子 crtW は、3 位の位置に水酸基が付加しているしていないにかかわらず、4 位のメチレン基を直接ケト基に変換する β -イオノンまたは 3-ヒドロキシ- β -イオノン環ケト基導入酵素 (β -ionone or 3-hydroxy- β -ionone ring ketolase) をコードしているといえることができる。なお、 β -イオノン環や 3-ヒドロキシ- β -イオノン環に限らず、1 つの酵素がメチレン基をいきなりケト基に変換するという知見は今まで存在しなかったものである。

(2) 水酸基導入酵素遺伝子の同定

β -カロチンからアスタキサンチンの合成に必要なすべての遺伝子は、pPC17 の 1.63 kb PstI-BstEII 断片（第19図）の中に含まれている。この pPC17 の 1.63 kb PstI-BstEII 断片の中に1ヶ所の SalI 部位が存在する。この SalI 部位の右側の断片に水酸基導入酵素活性が存在することは実施例12(3)の結果より明かである。したがって、水酸基導入酵素遺伝子は、1.63 kb PstI-BstEII 断片のうち右側の断片である 0.94 kb SalI-BstEII 断片に存在することがわかる。塩基配列決定の結果、この遺伝子に相当する、開始コドンの直前にリボソーム結合部位を有する1つのオープン・リーディング・フレームを検出することができたので、これを crtZ 遺伝子と命名した。この crtZ 遺伝子の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は第15図（配列番号6）に示されている。

この Alcaligenes sp. PC-1 の crtZ 遺伝子産物 (CrtZ) は、 β -イオノン環 (β -ionone ring) の3位の炭素に1つの水酸基を付加する酵素活性を有しており、その具体的な例の1つが、 β -カロチン (β -carotene) を基質として β -クリプトキサンチン (β -cryptoxanthin) を経てゼアキサンチン (zeaxanthin) を合成する酵素活性である（実施例12(3)、第11図参照）。さらに、crtZ 遺伝子産物は、4-ケト- β -イオノン環 (4-keto- β -ionone ring) の3位の炭素に1つの水酸基を付加

する酵素活性も有しており、その具体的な例の1つが、カンタキサンチン (canthaxanthin) を基質としてフェニコキサンチン (phoenicoxanthin) を経てアスタキサンチン (astaxanthin) を合成する酵素活性である (実施例 12 (1)、第 11 図参照)。なお、後者の酵素活性を有するポリペプチドおよびこれをコードする DNA 鎖は、従来知られていなかったものである。また、Alcaligenes sp. PC-1 の CrtZ は、アミノ酸配列レベルで、Erwinia uredovora の CrtZ と 58% のアイデンティティーという意義深いホモロジーを示した。なお、Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1 と Alcaligenes sp. PC-1 間の crtZ 遺伝子産物 (CrtZ) は、アミノ酸配列レベルで、90% のアイデンティティーという高いホモロジーを有しており、酵素の機能も両者で同一である。これらのアミノ酸配列の中で、アイデンティティーを有さない 10% の領域のアミノ酸配列は、酵素の機能にそれほど重要ではないと考えられる。したがって、特に、この領域においては、少しくらい他のアミノ酸と置換、あるいは、欠失、または他のアミノ酸の付加を行っても酵素活性に影響は与えないと考えられる。

(3) マイナーなキサントフィル生合成経路の考察

植物常在細菌 Erwinia や光合成細菌 Rhodobacter のカロチノイド合成遺伝子を用いた我々の研究により、一般に、カロチノイド生合成酵素は、基質となるカロチノイ

ド分子の半分を認識して作用することが明かになってきた。たとえば、Erwinia のリコピン環化酵素遺伝子である crtY はリコピン分子の半分ずつを認識して環化する。したがって、Rhodobacter のフィトエンデサチュラーゼ遺伝子 crtI を用いることによりリコピンの変わりにノイロスポレンを大腸菌に合成させ、これに Erwinia の crtY を作用させると、ノイロスポレンにおけるリコピンと共通な半分の分子構造だけを crtY 遺伝子産物は認識し、半分だけ環化した β -ゼアカロチンを産生する (Linden, H., Misawa, N., Chamovitz, D., Pecker, I., Hirschberg, J., Sandmann, G., 'Functional complementation in *Escherichia coli* of different phytoene desaturase genes and analysis of accumulated carotenes', Z. Naturforsch., 46c, p.1045-1051, 1991)。また、本発明においても、 β -カロチンやゼアキサントシンに CrtW を作用させると、まず1つケト基が導入されたエキネノンや4-ケトゼアキサントシンが合成されるし、 β -カロチンやカンタキサントシンに CrtZ を作用させると、まず1つ水酸基が導入された β -クリプトキサントシンやフェニコキサントシンが合成される。これは、これらの酵素が基質の半分の分子を認識するからと考えることができる。したがって、たとえば、Erwinia の crtE、crtB、crtI、crtY 遺伝子と海洋細菌の crtZ を有する大腸菌は、前述したように、ゼアキサントシンを産生するが、その中

間代謝産物として、 β -カロチンに1つ水酸基が導入された β -クリプトキサンチンを検出することができる。このことは、そこにCrtWが存在すると、 β -クリプトキサンチンを基質として3'-ヒドロキシエキネノンや3-ヒドロキシエキネンを合成することができ、さらに、これらにCrtWが作用してフェニコキサンチンを合成することができると思うことができる。今回、我々は、培養物中にこれらのケトカロチノイドを同定するには至っていないが、その理由は、今回行われた条件では、これらが微量しか存在しないためであると思われる。事実、一方の遺伝子源である海洋細菌 Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1におけるマイナーなアスタキサンチン中間代謝産物として、3-ヒドロキシエキネノンや3'-ヒドロキシエキネノンの検出が報告されている（横山昭裕、幹渉、「海洋性細菌におけるアスタキサンチン生合成について」平成6年度日本水産学会春季大会講演要旨集、p. 252, 1994）。以上のことより、第11図に示したアスタキサンチンの主要代謝経路の他に、図20に示したマイナーな代謝経路も存在すると思うことができる。

産業上の利用可能性

本発明において、海洋細菌よりアスタキサンチンやその他のケト基を含むキサントフィル（アスタキサンチン、フェニコキサンチン、4-ケトゼアキサンチン、カンタ

キサントニン、エキネニン)の生合成に必要な遺伝子群の取得に成功し、それらの遺伝子の構造ないし塩基配列およびそれらの機能を明かになった。従って、本発明によるDNA鎖は、それらを外来遺伝子として遺伝子工学的な手法により大腸菌等の微生物を形質転換し発現させることによって、大腸菌等の微生物にアスタキサントニンやその他のケトン基を含むキサントニルの生合成能を付与することが可能な遺伝子として有用である。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 639

配列の型 : 鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源 :

生物名 : Agrobacterium aurantiacus

株名 : sp. nov. MK1

配列

GTG CAT GCG CTG TGG TTT CTG GAC GCA GCG GCG CAT CCC ATC CTG GCG 48

Met His Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala

1 5 10 15

ATC GCA AAT TTC CTG GGG CTG ACC TGG CTG TCG GTC GGA TTG TTC ATC 96

Ile Ala Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile

20 25 30

ATC GCG CAT GAC GCG ATG CAC GGG TCG GTG GTG CCG GGG CGT CCG CGC 144

Ile Ala His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg

35 40 45

GCC AAT GCG GCG ATG GGC CAG CTT GTC CTG TGG CTG TAT GCC GGA TTT 192

Ala Asn Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe

50 55 60

TCG TGG CGC AAG ATG ATC GTC AAG CAC ATG GCC CAT CAC CGC CAT GCC	240
Ser Trp Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala	
65 70 75 80	
GGA ACC GAC GAC GAC CCC GAT TTC GAC CAT GGC GGC CCG GTC CGC TGG	288
Gly Thr Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp	
85 90 95	
TAC GCC CGC TTC ATC GGC ACC TAT TTC GGC TGG CGC GAG GGG CTG CTG	336
Tyr Ala Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu	
100 105 110	
CTG CCC GTC ATC GTG ACG GTC TAT GCG CTG ATC CTT GGG GAT CGC TGG	384
Leu Pro Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp	
115 120 125	
ATG TAC GTG GTC TTC TGG CCG CTG CCG TCG ATC CTG GCG TCG ATC CAG	432
Met Tyr Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln	
130 135 140	
CTG TTC GTG TTC GGC ACC TGG CTG CCG CAC CGC CCC GGC CAC GAC GCG	480
Leu Phe Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala	
145 150 155 160	
TTC CCG GAC CGC CAC AAT GCG CGG TCG TCG CGG ATC AGC GAC CCC GTG	528
Phe Pro Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val	
165 170 175	
TCG CTG CTG ACC TGC TTT CAC TTT GGC GGT TAT CAT CAC GAA CAC CAC	576
Ser Leu Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His	
180 185 190	

CTG CAC CCG ACG GTG CCG TGG TGG CGC CTG CCC AGC ACC CGC ACC AAG 624

Leu His Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys

195

200

205

GGG GAC ACC GCA TGA

639

Gly Asp Thr Ala ***

210

配列番号：2

配列の長さ : 489

配列の型：鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源：

生物名: *Agrobacterium aurantiacus*

株名 : sp. nov. MK1

配列

ATG ACC AAT TTC CTG ATC GTC GTC GCC ACC GTG CTG GTG ATG GAG TTG	48
Met Thr Asn Phe Leu Ile Val Val Ala Thr Val Leu Val Met Glu Leu	
1 5 10 15	
ACG GCC TAT TCC GTC CAC CGC TGG ATC ATG CAC GGC CCC CTG GGC TGG	96
Thr Ala Tyr Ser Val His Arg Trp Ile Met His Gly Pro Leu Gly Trp	
20 25 30	
GGC TGG CAC AAG TCC CAC CAC GAG GAA CAC GAC CAC GCG CTG GAA AAG	144
Gly Trp His Lys Ser His His Glu Glu His Asp His Ala Leu Glu Lys	
35 40 45	
AAC GAC CTG TAC GGC CTG GTC TTT GCG GTG ATC GCC ACG GTG CTG TTC	192
Asn Asp Leu Tyr Gly Leu Val Phe Ala Val Ile Ala Thr Val Leu Phe	
50 55 60	

ACG GTG GGC TGG ATC TGG GCG CCG GTC CTG TGG TGG ATC GCC TTG GGC 240
 Thr Val Gly Trp Ile Trp Ala Pro Val Leu Trp Trp Ile Ala Leu Gly
 65 70 75 80
 ATG ACT GTC TAT GGG CTG ATC TAT TTC GTC CTG CAT GAC GGG CTG GTG 288
 Met Thr Val Tyr Gly Leu Ile Tyr Phe Val Leu His Asp Gly Leu Val
 85 90 95
 CAT CAG CGC TGG CCG TTC CGT TAT ATC CCG CGC AAG GGC TAT GCC AGA 336
 His Gln Arg Trp Pro Phe Arg Tyr Ile Pro Arg Lys Gly Tyr Ala Arg
 100 105 110
 CGC CTG TAT CAG GCC CAC CGC CTG CAC CAT GCG GTC GAG GGG CGC GAC 384
 Arg Leu Tyr Gln Ala His Arg Leu His His Ala Val Glu Gly Arg Asp
 115 120 125
 CAT TGC GTC AGC TTC GGC TTC ATC TAT GCG CCC CCG GTC GAC AAG CTG 432
 His Cys Val Ser Phe Gly Phe Ile Tyr Ala Pro Pro Val Asp Lys Leu
 130 135 140
 AAG CAG GAC CTG AAG ATG TCG GGC GTG CTG CGG GCC GAG GCG CAG GAG 480
 Lys Gln Asp Leu Lys Met Ser Gly Val Leu Arg Ala Glu Ala Gln Glu
 145 150 155 160
 CGC ACG TGA 489
 Arg Thr ---

配列番号 : 3

配列の長さ : 1 1 6 1

配列の型 : 鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源 :

生物名 : Agrobacterium aurantiacus

株名 : sp. nov. MK1

配列

GTG ACC CAT GAC GTG CTG CTG GCA GGG GCG GGC CTT GCC AAC GGG CTG	48
Met Thr His Asp Val Leu Leu Ala Gly Ala Gly Leu Ala Asn Gly Leu	
1 5 10 15	
ATC GCC CTG GCG CTG CGC GCG GCG CGG CCC GAC CTG CGC GTG CTG CTG	96
Ile Ala Leu Ala Leu Arg Ala Ala Arg Pro Asp Leu Arg Val Leu Leu	
20 25 30	
CTG GAC CAT GCC GCA GGA CCG TCA GAC GGC CAC ACC TGG TCC TGC CAC	144
Leu Asp His Ala Ala Gly Pro Ser Asp Gly His Thr Trp Ser Cys His	
35 40 45	
GAC CCC GAC CTG TCG CCG GAC TGG CTG GCG CGG CTG AAG CCC CTG CGC	192
Asp Pro Asp Leu Ser Pro Asp Trp Leu Ala Arg Leu Lys Pro Leu Arg	
50 55 60	

CGC GCC AAC TGG CCC GAC CAG GAG GTG CGC TTT CCC CGC CAT GCC CGG	240
Arg Ala Asn Trp Pro Asp Gln Glu Val Arg Phe Pro Arg His Ala Arg	
65 70 75 80	
CGG CTG GCC ACC GGT TAC GGG TCG CTG GAC GGG GCG GCG CTG GCG GAT	288
Arg Leu Ala Thr Gly Tyr Gly Ser Leu Asp Gly Ala Ala Leu Ala Asp	
85 90 95	
GCG GTG GTC CGG TCG GGC GCC GAG ATC CGC TGG GAC AGC GAC ATC GCC	336
Ala Val Val Arg Ser Gly Ala Glu Ile Arg Trp Asp Ser Asp Ile Ala	
100 105 110	
CTG CTG GAT GCG CAG GGG GCG ACG CTG TCC TGC GGC ACC CGG ATC GAG	384
Leu Leu Asp Ala Gln Gly Ala Thr Leu Ser Cys Gly Thr Arg Ile Glu	
115 120 125	
GCG GGC GCG GTC CTG GAC GGG CGG GGC GCG CAG CCG TCG CGG CAT CTG	432
Ala Gly Ala Val Leu Asp Gly Arg Gly Ala Gln Pro Ser Arg His Leu	
130 135 140	
ACC GTG GGT TTC CAG AAA TTC GTG GGT GTC GAG ATC GAG ACC GAC CGC	480
Thr Val Gly Phe Gln Lys Phe Val Gly Val Glu Ile Glu Thr Asp Arg	
145 150 155 160	
CCC CAC GGC GTG CCC CGC CCG ATG ATC ATG GAC GCG ACC GTC ACC CAG	528
Pro His Gly Val Pro Arg Pro Met Ile Met Asp Ala Thr Val Thr Gln	
165 170 175	
CAG GAC GGG TAC CGC TTC ATC TAT CTG CTG CCC TTC TCT CCG ACC CGC	576
Gln Asp Gly Tyr Arg Phe Ile Tyr Leu Leu Pro Phe Ser Pro Thr Arg	
180 185 190	

ATC CTG ATC GAG GAC ACG CGC TAT TCC GAT GGC GGC GAT CTG GAC GAC 624
 Ile Leu Ile Glu Asp Thr Arg Tyr Ser Asp Gly Gly Asp Leu Asp Asp
 195 200 205
 GAC GCG CTG GCG GCG GCG TCC CAC GAC TAT GCC CGC CAG CAG GGC TGG 672
 Asp Ala Leu Ala Ala Ala Ser His Asp Tyr Ala Arg Gln Gln Gly Trp
 210 215 220
 ACC GGG GCC GAG GTC CGG CGC GAA CGC GGC ATC CTT CCC ATC GCG CTG 720
 Thr Gly Ala Glu Val Arg Arg Glu Arg Gly Ile Leu Pro Ile Ala Leu
 225 230 235 240
 GCC CAT CAT GCG GCG GGC TTC TGG GCC GAT CAC GCG GCG GGG CCT GTT 768
 Ala His Asp Ala Ala Gly Phe Trp Ala Asp His Ala Ala Gly Pro Val
 245 250 255
 CCC GTG GGA CTG CGC GCG GGG TTC TTT CAT CCG GTC ACC GGC TAT TCG 816
 Pro Val Gly Leu Arg Ala Gly Phe Phe His Pro Val Thr Gly Tyr Ser
 260 265 270
 CTG CCC TAT GCG GCA CAG GTG GCG GAC GTG GTG GCG GGT CTG TCC GGG 864
 Leu Pro Tyr Ala Ala Gln Val Ala Asp Val Val Ala Gly Leu Ser Gly
 275 280 285
 CCG CCC GGC ACC GAC GCG CTG CGC GGC GCC ATC CGC GAT TAC GCG ATC 912
 Pro Pro Gly Thr Asp Ala Leu Arg Gly Ala Ile Arg Asp Tyr Ala Ile
 290 295 300
 GAC CGG GCG CGC CGC GAC CGC TTT CTG CGC CTT TTG AAC CGG ATG CTG 960
 Asp Arg Ala Arg Arg Asp Arg Phe Leu Arg Leu Leu Asn Arg Met Leu
 305 310 315 320

TTC CGC GGC TGC GCG CCC GAC CGG CGC TAT ACC CTG CTG CAG CGG TTC 1008
 Phe Arg Gly Cys Ala Pro Asp Arg Arg Tyr Thr Leu Leu Gln Arg Phe
 325 330 335
 TAC CGC ATG CCG CAT GGA CTG ATC GAA CGG TTC TAT GCC GGC CGG CTG 1056
 Tyr Arg Met Pro His Gly Leu Ile Glu Arg Phe Tyr Ala Gly Arg Leu
 340 345 350
 AGC GTG GCG GAT CAG CTG CGC ATC GTG ACC GGC AAG CCT CCC ATT CCC 1104
 Ser Val Ala Asp Gln Leu Arg Ile Val Thr Gly Lys Pro Pro Ile Pro
 355 360 365
 CTT GGC ACG GCC ATC CGC TGC CTG CCC GAA CGT CCC CTG CTG AAG GAA 1152
 Leu Gly Thr Ala Ile Arg Cys Leu Pro Glu Arg Pro Leu Leu Lys Glu
 370 375 380
 AAC GCA TGA 1161
 Asn Ala ***
 385

配列番号 : 4

配列の長さ : 2 8 8 6

配列の型 : 鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源 :

生物名 : Agrobacterium aurantiacus

株名 : sp. nov. MK1

配列

GGATCCGGCG ACCTTGCGGC GCTGCGCCGC GCGCCTTTGC TGGTGCCTGG GCCGGGTGGC 60

CCTAGGCCGC TGGAACGCCG CGACGCGCGC CGCGGAAACG ACCACGGACC CGGCCACCG

CAATGGTCGC AAGCAACGGG GATGGAAACC GGCGATGCGG GACTGTAGTC TCGCGGATC 120

GTTACCAGCG TTCGTTGCCC CTACCTTTGG CCGCTACGCC CTGACATCAG ACGCGCCTAG

GCCGGTCCGG GGGACAAGAT GAGCGCACAT GCCCTGCCCC AGGCAGATCT GACCGCCACC 180

CGGCCAGGCC CCCTGTTCTA CTCGCGTGTA CGGGACGGGT TCCGTCTAGA CTGGCGGTGG

AGCCTGATCG TCTCGGGCGG CATCATCGCC GCTTGGCTGG CCCTGCATGT GCATGCGCTG 240

TCCGACTAGC AGAGCCCGCC GTAGTAGCGG CGAACCGACC GGGACGTACA CGTACGCGAC

TGGTTTCTGG ACGCAGCGGC GCATCCCATC CTGGCGATCG CAAATTCCT GGGGCTGACC 300

ACCAAAGACC TCGGTCGCCG CGTAGGGTAG GACCGCTAGC GTTTAAAGGA CCCCAGCTGG

TGGCTGTCGG TCGGATTGTT CATCATCGCG CATGACGCGA TGCACGGGTC GGTGGTGCCG 360
ACCGACAGCC AGCCTAACAA GTAGTAGCGC GTACTGCGCT ACGTGCCAG CCACCACGGC

GGGCGTCCGC GCGCCAATGC GGGGATGGGC CAGCTTGTC TGTGGCTGTA TGCCGGATTT 420
CCCGCAGGCG CGCGGTACG CCGCTACCCG GTCGAACAGG ACACCGACAT ACGGCCTAAA

TCGTGGCGCA AGATGATCGT CAAGCACATG GCCCATCACC GCCATGCCGG AACCGACGAC 480
AGCACCGCGT TCTACTAGCA GTTCGTGTAC CGGGTAGTGG CGGTACGGCC TTGGCTGCTG

GACCCCGATT TCGACCATGG CGGCCCCGGTC CGCTGGTACG CCCGCTTCAT CGGCACCTAT 540
CTGGGGCTAA AGCTGGTACC GCGGGGCCAG GCGACCATGC GGGCGAAGTA GCCGTGGATA

TTCGGCTGGC GCGAGGGGCT GCTGCTGCCC GTCATCGTGA CGGTCTATGC GCTGATCCTT 600
AAGCCGACCG CGCTCCCCGA CGACGACGGG CAGTAGCACT GCCAGATACG CGACTAGGAA

GGGGATCGCT GGATGTACGT GGTCTTCTGG CCGCTGCCGT CGATCCTGGC GTCGATCCAG 660
CCCCTAGCGA CCTACATGCA CCAGAAGACC GCGGACGGCA GCTAGGACCG CAGCTAGGTC

CTGTTCTGT TCGGCACCTG GCTGCCGCAC CGCCCCGGCC ACGACGCGTT CCCGGACCGC 720
GACAAGCACA AGCCGTGGAC CGACGGCGTG GCGGGGCCGG TGCTGCGCAA GGGCCTGGCG

CACAATGCGC GGTCGTGCGG GATCAGCGAC CCCGTGTGCG TGCTGACCTG CTTTCACTTT 780
GTGTTACCGC CCAGCAGCGC CTAGTCGCTG GGGCACAGCG ACGACTGGAC GAAAGTGAAA

GGCGGTATC ATCACGAACA CCACCTGCAC CCGACGGTGC CGTGGTGGCG CCTGCCCAGC 840

CCGCCAATAG TAGTGCTTGT GGTGGACGTG GGCTGCCACG GCACCACCGC GGACGGGTGC

ACCCGCACCA AGGGGGACAC CGCATGACCA ATTCCTGAT CGTCGTGGCC ACCGTGCTGG 900

TGGGCGTGGT TCCCCCTGTG GCGTACTGGT TAAAGGACTA GCAGCAGCGG TGGCACCACC

TGATGGAGTT GACGGCCTAT TCCGTCCACC GCTGGATCAT GCACGGCCCC CTGGGCTGGG 960

ACTACCTCAA CTGCCGGATA AGGCAGGTGG CGACCTAGTA CGTGCCGGGG GACCCGACCC

GCTGGCACAA GTCCCACCAC GAGGAACACG ACCACGGCGT GGAAAAGAAC GACCTGTACG 1020

CGACCGTGTT CAGGGTGGTG CTCCTTGTGC TGGTGCGCGA CCTTTTCTTG CTGGACATGC

GCCTGGTCTT TGGGGTGATC GCCACGGTGC TGTTCACGGT GGGCTGGATC TGGGCGCCGG 1080

CGGACCAGAA ACGCCACTAG CGGTGCCACG ACAAGTGCCA CCCGACCTAG ACCCGCGGCC

TCCTGTGGTG GATCGCCTTG GGCATGACTG TCTATGGGCT GATCTATTTT GTCCTGCATG 1140

AGGACACCAC CTAGCGGAAC CCGTACTGAC AGATACCCGA CTAGATAAAG CAGGACGTAC

ACGGGCTGGT GCATCAGCGC TGGCCGTTCC GTTATATCCC GCGCAAGGGC TATGCCAGAC 1200

TGCCCCACCA CGTAGTCGCG ACCGGCAAGG CAATATAGGG CGCGTTCCCG ATACGGTCTG

GCCTGTATCA GGCCCACCGC CTGCACCATG CGGTCGAGGG GCGCGACCAT TGCCTCAGCT 1260

CGGACATAGT CCGGGTGGCG GACGTGGTAC GCCAGCTCCC CGCGCTGGTA ACGCAGTCGA

TCGGCTTCAT CTATGCGCCC CCGGTCGACA AGCTGAAGCA GGACCTGAAG ATGTCGGGCG 1320
AGCCGAAGTA GATACGCGGG GGCAGCTGT TCGACTTCGT CCTGGACTTC TACAGCCCCG

TGCTGCGGGC CGAGGCGCAG GAGCGCACGT GACCCATGAC GTGCTGCTGG CAGGGGCGGG 1380
ACGACGCCCC GCTCCGCGTC CTCGCGTGCA CTGGGTACTG CACGACGACC GTCCCCGCCC

CCTTGCCAAC GGGCTGATCG CCCTGGCGCT GCGCGCGGGC CGGCCCCACC TCGCGTGCT 1440
GGAACGGTTG CCCGACTAGC GGGACCGCGA CCGCGCGCGC GCGGGCTGG ACGCGCACGA

GCTGCTGGAC CATGCCGCAG GACCGTCAGA CGGCCACACC TGGTCCTGCC ACGACCCCGA 1500
CGACGACCTG GTACGGCGTC CTGGCAGTCT GCCGGTGTGG ACCAGGACGG TGCTGGGGCT

CCTGTGCGCG GACTGGCTGG CGCGGCTGAA GCCCTGCGC CGCGCCAAC TGGCCGACCA 1560
GGACAGCGGC CTGACCGACC GCGCCGACTT CGGGGACGCG GCGCGGTGA CCGGGCTGGT

GGAGGTGCGC TTTCCCCGCC ATGCCCGCG GCTGGCCACC GGTACGGGT CGCTGGACGG 1620
CCTCCACCGG AAAGGGGCGG TACGGCGCGC CGACCGGTGG CCAATGCCCA GCGACCTGCC

GGCGGCGCTG GCGGATGCGG TGGTCCGGTC GGGCGCCGAG ATCCGCTGGG ACAGCGACAT 1680
CCGCGCGGAC CGCCTACGCC ACCAGGCCAG CCCGCGGCTC TAGGCGACCC TGTCGCTGTA

CGCCCTGCTG GATGCGCAGG GGGCGACGCT GTCCTGCGGC ACCCGGATCG AGGCGGGCGC 1740
GCGGGACGAC CTACGCGTCC CCCGCTGCGA CAGGACGCGG TGGGCCTAGC TCCGCCCGCG

GGTCCTGGAC GGGCGGGGCG CGCAGCCGTC GCGGCATCTG ACCGTGGGTT TCCAGAAATT 1800
CCAGGACCTG CCCGCCCCCG GCGTCGGCAG CGCCGTAGAC TGGCACCCAA AGGTCTTTAA

CGTGGGTGTC GAGATCGAGA CCGACCGCCC CCACGGCGTG CCCCCCCCGA TGATCATGGA 1860
GCACCCACAG CTCTAGCTCT GGCTGGCGGG GGTGCCGCAC GGGGCGGGCT ACTAGTACCT

CGCGACCGTC ACCCAGCAGG ACGGGTACCG CTTTCATCTAT CTGCTGCCCT TCTCTCCGAC 1920
GCGCTGGCAG TGGGTCGTCC TGCCCATGGC GAAGTAGATA GACGACGGGA AGAGAGGCTG

GCGCATCCTG ATCGAGGACA CGCGCTATTC CGATGGCGGC GATCTGGACG ACGACGCGCT 1980
CGCGTAGGAC TAGCTCCTGT GCGCGATAAG GCTACCGCCG CTAGACCTGC TGCTGCGCGA

GGCGGCGGCG TCCCACGACT ATGCCCCGCCA GCAGGGCTGG ACCGGGGCCG AGGTCCGGCG 2040
CGCGCGCCCG AGGGTCCTGA TACGGGCGGT CGTCCCGACC TGGCCCCGGC TCCAGGCCCC

CGAACGCGGC ATCCTTCCCA TCGCGCTGGC CCATGATGCG GCGGGCTTCT GGGCCGATCA 2100
GCTTGCGCCG TAGGAAGGGT AGCGCGACCG GGTACTACGC CGCCCGAAGA CCCGGCTAGT

CGCGGCGGGG CCTGTCCCG TGGGACTGCG CGCGGGGTTT TTTCATCCGG TCACCGGCTA 2160
GCGCGGCCCC GGACAAGGGC ACCCTGACCG GCGCCCCAAG AAAGTAGGCC AGTGGCCGAT

TTCGCTGCCC TATGCGGCAC AGGTGGCGGA CGTGGTGGCG GGTCTGTCCG GGCGGCCCCG 2220
AAGCGACGGG ATACGCCGTG TCCACCGCCT GCACCACCGC CCAGACAGGC CCGGCGGGCC

CACCGACGCG CTGCGGGGCG CCATCCGCGA TTACGCGATC GACCGGGGCG GCCGCGACCG 2280
GTGGCTGCGC GACGCGCCGC GGTAGGCGCT AATGCGCTAG CTGGCCCGCG CGGCGCTGGC

CTTTCTGCGC CTTTGAACC GGATGCTGTT CCGCGGCTGC GCGCCCGACC GGGCTATAC 2340
GAAAGACGCG GAAACTTGG CCTACGACAA GCGCCCGACC CGCGGGCTGG CCGCGATATG

CCTGCTGCAG CGGTTCTACC GCATGCCGCA TGGACTGATC GAACGGTTCT ATGCCGGCCG 2400
GGACGACGTC GCCAAGATGG CGTACGGCGT ACCTGACTAG CTTGCCAAGA TACGGCCGGC

GCTGAGCGTG GCGGATCAGC TGGCATCGT GACCGGCAAG CCTCCATTTC CCCTTGGCAC 2460
CGACTCGCAC CGCCTAGTCG ACGCGTAGCA CTGGCCGTTT GGAGGGTAAG GGAACCGTG

GGCCATCCGC TGCCTGCCCC AACGTCCCCT GCTGAAGGAA AACGCATGAA CGCCCATTCG 2520
CCGGTAGGCG ACGGACGGGC TTGCAGGGGA CGACTTCCTT TTGCGTACTT GCGGGTAAGC

CCCGCGGCCA AGACCGCCAT CGTGATCGGC GCAGGCTTTG GCGGGCTGGC CCTGGCCATC 2580
GGGCGCCGGT TCTGGCGGTA GCACTAGCCG CGTCCGAAAC CGCCCGACCG GGACCGGTAG

CGCCTGCAGT CCGCGGGCAT CGCCACCACC CTGGTCGAGG CCCGGGACAA GCCCGGCGGG 2640
GCGGACGTCA GCGCCCGTA GCGGTGGTGG GACCAGCTCC GGGCCCTGTT CGGGCCGCCC

CGCGCCTATG TCTGGCACGA TCAGGGCCAT CTCTTCGACG CGGGCCCGAC CGTCATCACC 2700
GCGCGGATAC AGACCGTGCT AGTCCCGGTA GAGAAGCTGC GCCCGGGCTG GCAGTAGTGG

GACCCCGATG CGCTGAAAGA GCTGTGGGCC CTGACCGGGC AGGACATGGC GCGCGACGTG 2760
CTGGGGCTAC GCGACTTTCT CGACACCCGG GACTGGCCCG TCCTGTACCG CCGGCTGCAC

ACGCTGATGC CCGTCTCGCC CTTCTATCGG CTGATGTGGC CGGGCGGGAA GGTCTTCGAT 2820
TGGGACTACG GCCAGAGCGG GAAGATAGCC GACTACACCG GCGCGCCCTT CCAGAAGCTA

TACGTGAACG AGGCCGATCC AGGGTCTGGG TCTTGCCGTG CCAGGTGAAG CTGTTGCCCT 2880
ATGCACTTGC TCCGGCTAGG TCCCAGACCC AGAACGGCAC GGTCCACTTC GACAACGGCA

GGATCC

2886

CCTAGG

株名: sp. PC-1

ATG TCC GGA CGG AAG CCT GGC ACA ACT GGC GAC ACG ATC GTC AAT CTC	48
Met Ser Gly Arg Lys Pro Gly Thr Thr Gly Asp Thr Ile Val Asn Leu	
1 5 10 15	
GGT CTG ACC GCC GCG ATC CTG CTG TGC TGG CTG GTC CTG CAC GCC TTT	96
Gly Leu Thr Ala Ala Ile Leu Leu Cys Trp Leu Val Leu His Ala Phe	
20 25 30	
ACG CTA TGG TTG CTA GAT GCG GCC GCG CAT CCG CTG CTT GCC GTG CTG	144
Thr Leu Trp Leu Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Leu Leu Ala Val Leu	
35 40 45	
TGC CTG GCT GGG CTG ACC TGG CTG TCG GTC GGG CTG TTC ATC ATC GCG	192
Cys Leu Ala Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala	
50 55 60	

— 93 —

GAC CGG CAC AAC GCG AGG TCG ACC GGC ATC GGC GAC CCG TTG TCA CTA	624
Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Thr Gly Ile Gly Asp Pro Leu Ser Leu	
195	200
CTG ACC TGC TTC CAT TTC GGC GGC TAT CAC CAC GAA CAT CAC CTG CAT	672
Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His	
210	215
CCG CAT GTG CCG TGG TGG CGC CTG CCT CGT ACA CGC AAG ACC GGA GGC	720
Pro His Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Arg Thr Arg Lys Thr Gly Gly	
225	230
CGC GCA TGA	729
Arg Ala***	

配列番号 : 6

配列の長さ : 489

配列の型 : 鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源 :

生物名 : Alcaligenes

株名 : sp. PC-1

配列

ATG ACG CAA TTC CTC ATT GTC GTG GCG ACA GTC CTC GTG ATG GAG CTG	48
Met Thr Gln Phe Leu Ile Val Val Ala Thr Val Leu Val Met Glu Leu	
5 10 15	
ACC GCC TAT TCC GTC CAC CGC TGG ATT ATG CAC GGC CCC CTA GGC TGG	96
Thr Ala Tyr Ser Val His Arg Trp Ile Met His Gly Pro Leu Gly Trp	
20 25 30	
GGC TGG CAC AAG TCC CAT CAC GAA GAG CAC GAC CAC GCG TTG GAG AAG	144
Gly Trp His Lys Ser His His Glu Glu His Asp His Ala Leu Glu Lys	
35 40 45	
AAC GAC CTC TAC GGC GTC GTC TTC GCG GTG CTG GCG ACG ATC CTC TTC	192
Asn Asp Leu Tyr Gly Val Val Phe Ala Val Leu Ala Thr Ile Leu Phe	
50 55 60	

ACC GTG GGC GCC TAT TGG TGG CCG GTG CTG TGG TGG ATC GCC CTG GGC	240
Thr Val Gly Ala Tyr Trp Trp Pro Val Leu Trp Trp Ile Ala Leu Gly	
65 70 75 80	
ATG ACG GTC TAT GGG TTG ATC TAT TTC ATC CTG CAC GAC GGG CTT GTG	288
Met Thr Val Tyr Gly Leu Ile Tyr Phe Ile Leu His Asp Gly Leu Val	
85 90 95	
CAT CAA CGC TGG CCG TTT CGG TAT ATT CCG CGG CGG GGC TAT TTC CGC	336
His Gln Arg Trp Pro Phe Arg Tyr Ile Pro Arg Arg Gly Tyr Phe Arg	
100 105 110	
AGG CTC TAC CAA GCT CAT CGC CTG CAC CAC GCG GTC GAG GGG CGG GAC	384
Arg Leu Tyr Gln Ala His Arg Leu His His Ala Val Glu Gly Arg Asp	
115 120 125	
CAC TGC GTC AGC TTC GGC TTC ATC TAT GCC CCA CCC GTG GAC AAG CTG	432
His Cys Val Ser Phe Gly Phe Ile Tyr Ala Pro Pro Val Asp Lys Leu	
130 135 140	
AAG CAG GAT CTG AAG CGG TCG GGT GTC CTG CGC CCC CAG GAC GAG CGT	480
Lys Gln Asp Leu Lys Arg Ser Gly Val Leu Arg Pro Gln Asp Glu Arg	
145 150 155 160	
CCG TCG TGA	489
Pro Ser ***	

配列番号 : 7

配列の長さ : 1 6 3 1

配列の型 : 鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源 :

生物名 : *Alcaligenes*

株名 : sp. PC-1

配列

CTGCAGGCCG GGGCCGGTGG CCAATGGTCG CAACCGGCAG GACTGGAACA GGACGGCGGG 60

GACGTCCGGC CCGGGCCACC GGTACCAGC GTTGGCCGTC CTGACCTTGT CCTGCCGCCC

CCGGTCTAGG CTGTCGCCCT ACGCAGCAGG AGTTTCGGAT GTCCGGACGG AAGCCTGGCA 120

GGCCAGATCC GACAGCGGGA TCGTTCGTCC TCAAAGCCTA CAGGCCTGCC TTCGGACCGT

CAACTGGCGA CACGATCGTC AATCTCGGTC TGACCGCCGC GATCCTGCTG TGCTGGCTGG 180

GTTGACCGCT GTGCTAGCAG TTAGAGCCAG ACTGGCGGCG CTAGGACGAC ACGACCGACC

TCCTGCACGC CTTTACGCTA TGGTTGCTAG ATGCGGCCGC GCATCCGCTG CTTGCCGTGC 240

AGGACGTGCG GAAATGCGAT ACCAACGATC TACGCCGGCG CGTAGGCGAC GAACGGCAGC

TGTGCCTGGC TGGGCTGACC TGGCTGTCCG TCGGGCTGTT CATCATCGCG CATGACGCAA 300
ACACGGACCG ACCCGACTGG ACCGACAGCC AGCCCGACAA GTAGTAGCGC GTACTGCGTT

TGCACGGGTC CGTGGTGCCG GGGCGGCCGC GCGCCAATGC GCGGATCGGG CAACTGGCGC
ACGTGCCCAG GCACCACGGC CCCGCCGGCG CGCGGTACG CCGCTAGCCC GTTGACCGCG 360

TGTGGCTCTA TCGGGGGTTC TCGTGGCCCA AGCTGATCGC CAAGCACATG ACGCATCACC 420
ACACCGAGAT ACGCCCCAAG AGCACCAGGT TCGACTAGCG GTTCGTGTAC TCGTAGTGG

GGCACGCCCG CACCGACAAC GATCCCGATT TCGGTCACGG AGGGCCCGTG CGCTGGTACG 480
CCGTGCGGCC GTGGCTGTTG CTAGGGCTAA AGCCAGTGCC TCCCGGGCAC GCGACCATGC

GCAGCTTCGT CTCCACCTAT TTCGGCTGGC GAGAGGGA CTGCTACCG GTGATCGTCA 540
CGTCGAAGCA GAGGTGGATA AAGCCGACCG CTCTCCCTGA CGACGATGGC CACTAGCAGT

CCACCTATGC GCTGATCCTG GCGGATCGCT GGATGTATGT CATCTTCTGG CCGGTCCCGG 600
GGTGGATACG CGACTAGGAC CCGCTAGCGA CCTACATACA GTAGAAGACC GGCCAGGGCC

CCGTTCTGGC GTCGATCCAG ATTTTCGTCT TCGGAACTTG GCTGCCCCAC CGCCCGGGAC 660
GGCAAGACCG CAGCTAGGTC TAAAAGCAGA AGCCTTGAAC CGACGGGGTG GCGGGCCCTG

ATGACGATTT TCCCGACCGG CACAACCGGA GGTGACCGG CATCGGCGAC CCGTTGTCAC 720
TACTGCTAAA AGGGCTGGCC GTGTTGCGCT CCAGCTGGCC GTAGCCGCTG GGCAACAGTG

TACTGACCTG CTTCCATTTC GCGGCTATC ACCACGAACA TCACCTGCAT CCGCATGTGC 780
ATGACTGGAC GAAGGTAAAG CCGCCGATAG TGGTGCTTGT AGTGGACGTA GGCCTACACG

CGTGGTGGCG CCTGCCTCGT ACACGCAAGA CCGGAGGCCG CGCATGACGC AATTCCTCAT 840
GCACCACCGC GGACGGAGCA TGTGCGTTCT GGCCTCCGGC GCGTACTGCC TTAAGGAGTA

TGTCGTGGCG ACAGTCCTCG TGATGGAGCT GACCGCCTAT TCCGTCCACC GCTGGATTAT 900
ACAGCACCGC TGTCAGGAGC ACTACCTCGA CTGGCGGATA AGGCAGGTGG CGACCTAATA

GCACGGCCCC CTAGGCTGGG GCTGGCACAA GTCCATCAC GAAGAGCAGC ACCACGCGTT 960
CGTGCCGGGG GATCCGACCC CGACCGTGT CAGGGTAGTG CTTCTCGTGC TGGTGCGCAA

GGAGAAGAAC GACCTCTACG GCGTCGTCTT CGCGGTGCTG GCGACGATCC TCTTCACCGT 1020
CCTCTTCTTG CTGGAGATGC CGCAGCAGAA GCGCCACGAC CGCTGCTAGG AGAAGTGGCA

GGGCGCCTAT TGGTGGCCGG TGCTGTGGTG GATCGCCCTG GGCATGACGG TCTATGGGTT 1080
CCCGCGGATA ACCACCGGCC ACGACACCAC CTAGCGGGAC CCGTACTGCC AGATACCCAA

GATCTATTTT ATCCTGCACG ACGGGCTTGT GCATCAACGC TGGCCGTTTC GGTATATTCC 1140
CTAGATAAAG TAGGACGTGC TGCCCGAACA CGTAGTTGCG ACCGGCAAAG CCATATAAGG

GCGCGGGGGC TATTTCCGCA GGCTCTACCA AGCTCATCGC CTGCACCACG CCGTCGAGGG 1200
CGCCGCCCCG ATAAAGGCGT CCGAGATGGT TCGAGTAGCG GACGTGGTGC GCCAGCTCCC

GCGGGACCAC TCGTCAGCT TCGGCTTCAT CTATGCCCCA CCCGTGGACA AGCTGAAGCA 1260
CGCCCTGGTG ACGCAGTCGA AGCCGAAGTA GATACGGGGT GGGCACCTGT TCGACTTCGT

GGATCTGAAG CGGTCGGGTG TCCTGCGCCC CCAGGACGAG CGTCCGTCGT GATCTCTGAT 1320
CCTAGACTTC GCCAGCCCAC AGGACCGGGG GGTCTGCTC GCAGGCAGCA CTAGAGACTA

CCCGGCGTGG CCGCATGAAA TCCGACGTGC TGCTGGCAGG GGCCGGCCTT GCCAACGGAC 1380
GGGCGGCACC GGCCTACTTT AGGCTGCACG ACGACCGTCC CCGGCCGGAA CGGTTGCCCTG

TGATCGCGCT GCGGATCCGC AAGGCGCGGC CCGACCTTCG CGTGCTGCTG CTGGACCGTG 1440
ACTAGCGCGA CCGCTAGGCG TTCGCGCGCG GGCTGGAAGC GCACGACGAC GACCTGGCAC

CGCGGGGCGC CTCGGACGGG CATACTTGGT CCTGCCACGA CACCGATTTC GCGCCGCACT 1500
CGCGCCCGCG GAGCCTGCCC GTATGAACCA GGACGGTGCT GTGGCTAAAC CGCGGCGTGA

GGCTGGACCG CCTGAAGCCG ATCAGGCGTG GCGACTGGCC CGATCAGGAG GTGCGGTTCC 1560
CCGACCTGGC GGAATTCCGC TAGTCCGCAC CGCTGACCGG GCTAGTCCTC CACGCCAAGG

CAGACCATTG GCCAAGGCTC CGGGCCGGAT ATGGCTCGAT CGACGGGCGG GGGCTGATGC 1620
GTCTGGTAAG CGCTTCCGAG GCGCGGCCTA TACCGAGCTA GCTGCCCCCC CCCGACTACG

GTGCGGTGAC C

1631

CACGCCACTG G

請 求 の 範 囲

1. β -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に変換する酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

2. β -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号1に示したアミノ酸番号1から212までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

3. 請求の範囲第2項に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ請求の範囲第2項に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

4. β -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号5に示したアミノ酸番号1から242までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

5. 請求の範囲第4項に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ請求の範囲第4項に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

6. β -カロチンをエキネノンを経てカンタキサンチンに変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号1に示したアミノ酸番号1から212ま

でのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

7. 請求の範囲第6項に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ請求の範囲第6項に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

8. β -カロチンをエキネノンを経てカンタキサンチンに変換する酵素活性を有してアミノ酸配列が実質的に配列番号5に示したアミノ酸番号1から242までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

9. 請求の範囲第8項に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ請求の範囲第8項に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

10. 3-ヒドロキシ- β -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に変換する酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

11. 3-ヒドロキシ- β -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に変換する酵素活性を有してアミノ酸配列が実質的に配列番号1に示したアミノ酸番号1から212までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

12. 請求の範囲第11項に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ請求の範囲第11項に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有する

DNA 鎖。

13. 3-ヒドロキシ- β -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号5に示したアミノ酸番号1から242までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

14. 請求の範囲第13項に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ請求の範囲第13項に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

15. ゼアキサンチンを4-ケトゼアキサンチンを経てアスタキサンチンに変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号1に示したアミノ酸番号1から212までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

16. 請求の範囲第15項に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ請求の範囲第15項に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

17. ゼアキサンチンを4-ケトゼアキサンチンを経てアスタキサンチンに変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号5に示したアミノ酸番号1から242までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

18. 請求の範囲第17項に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ請求の範囲第17項に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

19. 4-ケト- β -イオノン環の3位の炭素に1つの水酸基を付加する酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

20. 4-ケト- β -イオノン環の3位の炭素に1つの水酸基を付加する酵素活性を有してアミノ酸配列が実質的に配列番号2に示したアミノ酸番号1から162までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

21. 請求の範囲第20項に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ請求の範囲第20項に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

22. 4-ケト- β -イオノン環の3位の炭素に1つの水酸基を付加する酵素活性を有してアミノ酸配列が実質的に配列番号6に示したアミノ酸番号1から162までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

23. 請求の範囲第22項に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ請求の範囲第22項に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有する

DNA 鎖。

24. カンタキサンチンをフェニコキサンチンを経てアスタキサンチンに転換する酵素活性を有してアミノ酸配列が実質的に配列番号2に示したアミノ酸番号1から162までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

25. 請求の範囲第24項に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ請求の範囲第24項に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

26. カンタキサンチンをフェニコキサンチンを経てアスタキサンチンに転換する酵素活性を有してアミノ酸配列が実質的に配列番号6に示したアミノ酸番号1から162までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

27. 請求の範囲第26項に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ請求の範囲第26項に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

28. 請求の範囲第1～9項のいずれか1の範囲第に記載のDNA鎖を、 β -カロチンを産生する能力を有する微生物に導入して該形質転換微生物を培地で培養し、培養物からカンタキサンチンまたはエキネノンを採取することを特徴とする、キサントフィルの製造法。

29. 請求の範囲第10～18項のいずれか1の範囲第に記載のDNA鎖を、ゼアキサンチンを産生する能力を有する微生物に導入して該形質転換微生物を培地で培養し、培養物からアスタキサンチンまたは4-ケトゼアキサンチンを採取することを特徴とする、キサントフィルの製造法。

30. 請求の範囲第19～27項のいずれか1の範囲第に記載のDNA鎖を、カンタキサンチンを産生する能力を有する微生物に導入して該形質転換微生物を培地で培養し、培養物からアスタキサンチンまたはフェニコキサンチンを採取することを特徴とする、キサントフィルの製造法。

31. 微生物が細菌または酵母である、請求の範囲第28～30項のいずれか1の範囲第に記載の製造法。

A
↓

237	246	255	264	273	282
GTG CAT GCG CTG TGG TTT CTG GAC GCA GCG GCG CAT CCC ATC CTG GCG ATC GCA					
Met His Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala					
291	300	309	318	327	336
AAT TTC CTG GGG CTG ACC TGG CTG TCG GTC GGA TTG TTC ATC ATC GCG CAT GAC					
Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp					
345	354	363	372	381	390
GCG ATG CAC GGG TCG GTG GTG CCG GGG CGT CCG CGC GCC AAT GCG GCG ATG GGC					
Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn Ala Ala Met Gly					
399	408	417	426	435	444
CAG CTT GTC CTG TGG CTG TAT GCC GGA TTT TCG TGG CGC AAG ATG ATC GTC AAG					
Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp Arg Lys Met Ile Val Lys					
453	462	471	480	489	498
CAC ATG GCC CAT CAC CGC CAT GCC GGA ACC GAC GAC GAC CCC GAT TTC GAC CAT					
His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His					
507	516	525	534	543	552
GGC GGC CCG GTC CGC TGG TAC GCC CGC TTC ATC GGC ACC TAT TTC GGC TGG CGC					
Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg					
561	570	579	588	597	606
GAG GGG CTG CTG CTG CCC GTC ATC GTG ACG GTC TAT GCG CTG ATC CTT GGG GAT					
Glu Gly Leu Leu Leu Pro Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp					
615	624	633	642	651	660
CGC TGG ATG TAC GTG GTC TTC TGG CCG CTG CCG TCG ATC CTG GCG TCG ATC CAG					
Arg Trp Met Tyr Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln					
669	678	687	696	705	714
CTG TTC GTG TTC GGC ACC TGG CTG CCG CAC CGC CCC GGC CAC GAC GCG TTC CCG					
Leu Phe Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro					
723	732	741	750	759	768
GAC CGC CAC AAT GCG CGG TCG TCG CGG ATC AGC GAC CCC GTG TCG CTG CTG ACC					
Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu Leu Thr					
777	786	795	804	813	822
TGC TTT CAC TTT GGC GGT TAT CAT CAC GAA CAC CAC CTG CAC CCG ACG GTG CCG					
Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His Pro Thr Val Pro					
831	840	849	858	867	
TGG TGG CGC CTG CCC AGC ACC CGC ACC AAG GGG GAC ACC GCA TGA					
Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp Thr Ala ***					

↑
B

FIG. 1

C
 ↓

872	881	890	899	908	917
ATG ACC AAT TTC CTG ATC GTC GTC GCC ACC GTG CTG GTG ATG GAG TTG ACG GCC					
Met Thr Asn Phe Leu Ile Val Val Ala Thr Val Leu Val Met Glu Leu Thr Ala					
926	935	944	953	962	971
TAT TCC GTC CAC CGC TGG ATC ATG CAC GGC CCC CTG GGC TGG GGC TGG CAC AAG					
Tyr Ser Val His Arg Trp Ile Met His Gly Pro Leu Gly Trp Gly Trp His Lys					
980	989	998	1007	1016	1025
TCC CAC CAC GAG GAA CAC GAC CAC GCG CTG GAA AAG AAC GAC CTG TAC GGC CTG					
Ser His His Glu Glu His Asp His Ala Leu Glu Lys Asn Asp Leu Tyr Gly Leu					
1034	1043	1052	1061	1070	1079
GTC TTT GCG GTG ATC GCC ACG GTG CTG TTC ACG GTG GGC TGG ATC TGG GCG CCG					
Val Phe Ala Val Ile Ala Thr Val Leu Phe Thr Val Gly Trp Ile Trp Ala Pro					
1088	1097	1106	1115	1124	1133
GTC CTG TGG TGG ATC GCC TTG GGC ATG ACT GTC TAT GGG CTG ATC TAT TTC GTC					
Val Leu Trp Trp Ile Ala Leu Gly Met Thr Val Tyr Gly Leu Ile Tyr Phe Val					
1142	1151	1160	1169	1178	1187
CTG CAT GAC GGG CTG GTG CAT CAG CGC TGG CCG TTC CGT TAT ATC CCG CGC AAG					
Leu His Asp Gly Leu Val His Gln Arg Trp Pro Phe Arg Tyr Ile Pro Arg Lys					
1196	1205	1214	1223	1232	1241
GGC TAT GCC AGA CGC CTG TAT CAG GCC CAC CGC CTG CAC CAT GCG GTC GAG GGG					
Gly Tyr Ala Arg Arg Leu Tyr Gln Ala His Arg Leu His His Ala Val Glu Gly					
1250	1259	1268	1277	1286	1295
CGC GAC CAT TGC GTC AGC TTC GGC TTC ATC TAT GCG CCC CCG GTC GAC AAG CTG					
Arg Asp His Cys Val Ser Phe Gly Phe Ile Tyr Ala Pro Pro Val Asp Lys Leu					
1304	1313	1322	1331	1340	1349
AAG CAG GAC CTG AAG ATG TCG GGC GTG CTG CGG GCC GAG GCG CAG GAG CGC ACG					
Lys Gln Asp Leu Lys Met Ser Gly Val Leu Arg Ala Glu Ala Gln Glu Arg Thr					
TGA					

↑
 D

FIG. 2

E
↓

1357	1366	1375	1384	1393	1402
GTG ACC CAT GAC GTG CTG CTG GCA GGG GCG GGC CTT GCC AAC GGG CTG ATC GCC					
Met Thr His Asp Val Leu Leu Ala Gly Ala Gly Leu Ala Asn Gly Leu Ile Ala					
1411	1420	1429	1438	1447	1456
CTG GCG CTG CGC GCG GCG CGG CCC GAC CTG CGC GTG CTG CTG CTG GAC CAT GCC					
Leu Ala Leu Arg Ala Ala Arg Pro Asp Leu Arg Val Leu Leu Leu Asp His Ala					
1465	1474	1483	1492	1501	1510
GCA GGA CCG TCA GAC GGC CAC ACC TGG TCC TGC CAC GAC CCC GAC CTG TCG CCG					
Ala Gly Pro Ser Asp Gly His Thr Trp Ser Cys His Asp Pro Asp Leu Ser Pro					
1519	1528	1537	1546	1555	1564
GAC TGG CTG GCG CGG CTG AAG CCC CTG CGC CGC GCC AAC TGG CCC GAC CAG GAG					
Asp Trp Leu Ala Arg Leu Lys Pro Leu Arg Arg Ala Asn Trp Pro Asp Gln Glu					
1573	1582	1591	1600	1609	1618
GTG CGC TTT CCC CGC CAT GCC CGG CGG CTG GCC ACC GGT TAC GGG TCG CTG GAC					
Val Arg Phe Pro Arg His Ala Arg Arg Leu Ala Thr Gly Tyr Gly Ser Leu Asp					
1627	1636	1645	1654	1663	1672
GGG GCG GCG CTG GCG GAT GCG GTG GTC CGG TCG GGC GCC GAG ATC CGC TGG GAC					
Gly Ala Ala Leu Ala Asp Ala Val Val Arg Ser Gly Ala Glu Ile Arg Trp Asp					
1681	1690	1699	1708	1717	1726
AGC GAC ATC GCC CTG CTG GAT GCG CAG GGG GCG ACG CTG TCC TGC GGC ACC CGG					
Ser Asp Ile Ala Leu Leu Asp Ala Gln Gly Ala Thr Leu Ser Cys Gly Thr Arg					
1735	1744	1753	1762	1771	1780
ATC GAG GCG GGC GCG GTC CTG GAC GGG CGG GGC GCG CAG CCG TCG CGG CAT CTG					
Ile Glu Ala Gly Ala Val Leu Asp Gly Arg Gly Ala Gln Pro Ser Arg His Leu					
1789	1798	1807	1816	1825	1834
ACC GTG GGT TTC CAG AAA TTC GTG GGT GTC GAG ATC GAG ACC GAC CGC CCC CAC					
Thr Val Gly Phe Gln Lys Phe Val Gly Val Glu Ile Glu Thr Asp Arg Pro His					
1843	1852	1861	1870	1879	1888
GGC GTG CCC CGC CCG ATG ATC ATG GAC GCG ACC GTC ACC CAG CAG GAC GGG TAC					
Gly Val Pro Arg Pro Met Ile Met Asp Ala Thr Val Thr Gln Gln Asp Gly Tyr					
1897	1906	1915	1924	1933	1942
CGC TTC ATC TAT CTG CTG CCC TTC TCT CCG ACG CGC ATC CTG ATC GAG GAC ACG					
Arg Phe Ile Tyr Leu Leu Pro Phe Ser Pro Thr Arg Ile Leu Ile Glu Asp Thr					
1951	1960	1969	1978	1987	1996
CGC TAT TCC GAT GGC GGC GAT CTG GAC GAC GAC GCG CTG GCG GCG GCG TCC CAC					
Arg Tyr Ser Asp Gly Gly Asp Leu Asp Asp Asp Ala Leu Ala Ala Ala Ser His					

FIG. 3

2005	2014	2023	2032	2041	2050
GAC TAT GCC CGC CAG CAG GGC TGG ACC GGG GCC GAG GTC CGG CGC GAA CGC GGC					
Asp Tyr Ala Arg Gln Gln Gly Trp Thr Gly Ala Glu Val Arg Arg Glu Arg Gly					
2059	2068	2077	2086	2095	2104
ATC CTT CCC ATC GCG CTG GCC CAT GAT GCG GCG GGC TTC TGG GCC GAT CAC GCG					
Ile Leu Pro Ile Ala Leu Ala His Asp Ala Ala Gly Phe Trp Ala Asp His Ala					
2113	2122	2131	2140	2149	2158
GCG GGG CCT GTT CCC GTG GGA CTG CGC GCG GGG TTC TTT CAT CCG GTC ACC GGC					
Ala Gly Pro Val Pro Val Gly Leu Arg Ala Gly Phe Phe His Pro Val Thr Gly					
2167	2176	2185	2194	2203	2212
TAT TCG CTG CCC TAT GCG GCA CAG GTG GCG GAC GTG GTG GCG GGT CTG TCC GGG					
Tyr Ser Leu Pro Tyr Ala Ala Gln Val Ala Asp Val Val Ala Gly Leu Ser Gly					
2221	2230	2239	2248	2257	2266
CCG CCC GGC ACC GAC GCG CTG CGC GGC GCC ATC CGC GAT TAC GCG ATC GAC CGG					
Pro Pro Gly Thr Asp Ala Leu Arg Gly Ala Ile Arg Asp Tyr Ala Ile Asp Arg					
2275	2284	2293	2302	2311	2320
GCG CGC CGC GAC CGC TTT CTG CGC CTT TTG AAC CGG ATG CTG TTC CGC GGC TGC					
Ala Arg Arg Asp Arg Phe Leu Arg Leu Leu Asn Arg Met Leu Phe Arg Gly Cys					
2329	2338	2347	2356	2365	2374
GCG CCC GAC CGG CGC TAT ACC CTG CTG CAG CGG TTC TAC CGC ATG CCG CAT GGA					
Ala Pro Asp Arg Arg Tyr Thr Leu Leu Gln Arg Phe Tyr Arg Met Pro His Gly					
2383	2392	2401	2410	2419	2428
CTG ATC GAA CGG TTC TAT GCC GGC CGG CTG AGC GTG GCG GAT CAG CTG CGC ATC					
Leu Ile Glu Arg Phe Tyr Ala Gly Arg Leu Ser Val Ala Asp Gln Leu Arg Ile					
2437	2446	2455	2464	2473	2482
GTG ACC GGC AAG CCT CCC ATT CCC CTT GGC ACG GCC ATC CGC TGC CTG CCC GAA					
Val Thr Gly Lys Pro Pro Ile Pro Leu Gly Thr Ala Ile Arg Cys Leu Pro Glu					
2491	2500	2509			
CGT CCC CTG CTG AAG GAA AAC GCA TGA					
Arg Pro Leu Leu Lys Glu Asn Ala ***					

↑
F

FIG. 4

10	20	30	40	50	60
*	*	*	*	*	*
GGATC	CGGCG	ACCTT	GCGGC	GCTGC	GCCGC
CCTAG	GCCGC	TGGAA	CGCCG	CGACG	CGGCG
70	80	90	100	110	120
*	*	*	*	*	*
CAATG	GTCGC	AAGCA	ACGGG	GATGG	AAACC
GTTAC	CAGCG	TTCGT	TGCCC	CTACC	TTTGG
130	140	150	160	170	180
*	*	*	*	*	*
GCCGG	TCCGG	GGGAC	AAGAT	GAGCG	CACAT
CGGCC	AGGCC	CCCTG	TTCTA	CTCGC	GTGTA
190	200	210	220	230	240
*	*	*	*	*	*
AGCCT	GATCG	TCTCG	GGCGG	CATCA	TCGCC
TCGGA	CTAGC	AGAGC	CCGCC	GTAGT	AGCGG
250	260	270	280	290	300
*	*	*	*	*	*
TGGTT	TCTGG	ACGCA	GCGGC	GCATC	CCATC
ACCAA	AGACC	TGCGT	CGCCG	CGTAG	GGTAG
310	320	330	340	350	360
*	*	*	*	*	*
TGGCT	GTCGG	TCGGA	TTGTT	CATCA	TCGCG
ACCGA	CAGCC	AGCCT	AACAA	GTAGT	AGCGC
370	380	390	400	410	420
*	*	*	*	*	*
GGGCG	TCCGC	GCGCC	AATGC	GGCGA	TGGGC
CCCCG	AGGCG	CGCGG	TTACG	CCGCT	ACCCG
430	440	450	460	470	480
*	*	*	*	*	*
TCGTG	GCGCA	AGATG	ATCGT	CAAGC	ACATG
AGCAC	CGCGT	TCTAC	TAGCA	GTTCG	TGTAC
490	500	510	520	530	540
*	*	*	*	*	*
GACCC	CGATT	TCGAC	CATGG	CGGCC	CGGTC
CTGGG	GCTAA	AGCTG	GTACC	GCCGG	GCCAG
550	560	570	580	590	600
*	*	*	*	*	*
TTCGG	CTGGC	GCGAG	GGGCT	GCTGC	TGCCC
AAGCC	GACCG	CGCTC	CCCAG	CGACG	ACGGG
610	620	630	640	650	660
*	*	*	*	*	*
GGGGA	TCGCT	GGATG	TACGT	GGTCT	TCTGG
CCCCT	AGCGA	CCTAC	ATGCA	CCAGA	AGACC

670	680	690	700	710	720
*	*	*	*	*	*
CTGTT	CGTGT	TCGGC	ACCTG	GCTGC	CGCAC
GACAA	GCACA	AGCCG	TGGAC	CGACG	GCGTG
CGCCC	CGGCC	ACGAC	GCGTT	CCCAG	ACCGC
730	740	750	760	770	780
*	*	*	*	*	*
CACAA	TGCGC	GGTCG	TCGCG	GATCA	GCGAC
GTGTT	ACGCG	CCAGC	AGCGC	CTAGT	CGCTG
GGGCA	CAGCG	ACGAC	TGGAC	GAAAG	TGAAA
790	800	810	820	830	840
*	*	*	*	*	*
GGCGG	TTATC	ATCAC	GAACA	CCACC	TGCAC
CCGCC	AATAG	TAGTG	CTTGT	GGTGG	ACGTG
GGCTG	CCACG	GCACC	ACCGC	GGACG	GGTCG
850	860	870	880	890	900
*	*	*	*	*	*
ACCCG	CACCA	AGGGG	GACAC	CGCAT	GACCA
TGGGC	GTGGT	TCCCC	CTGTG	GCGTA	CTGGT
TAAAG	GACTA	GCAGC	AGCGG	TGGCA	CGACC
910	920	930	940	950	960
*	*	*	*	*	*
TGATG	GAGTT	GACGG	CCTAT	TCCGT	CCACC
ACTAC	CTCAA	CTGCC	GGATA	AGGCA	GGTGG
CGACC	TAGTA	CGTGC	CGGGG	GACCC	GACCC
970	980	990	1000	1010	1020
*	*	*	*	*	*
GCTGG	CACAA	GTCCC	ACCAC	GAGGA	ACACG
CGACC	GTGTT	CAGGG	TGGTG	CTCCT	TGTGC
TGGTG	TGGTG	CGCGA	CCTTT	TCTTG	CTGGA
1030	1040	1050	1060	1070	1080
*	*	*	*	*	*
GCCTG	GTCTT	TGCGG	TGATC	GCCAC	GGTGC
CGGAC	CAGAA	ACGCC	ACTAG	CGGTG	CCACG
ACAAG	TGCCA	CCCGA	CCTAG	ACCCG	CGGCC
1090	1100	1110	1120	1130	1140
*	*	*	*	*	*
TCCTG	TGGTG	GATCG	CCTTG	GGCAT	GACTG
AGGAC	ACCAC	CTAGC	GGAAC	CCGTA	CTGAC
AGATA	CCCGA	CTAGA	TAAAG	CAGGA	CGTAC
1150	1160	1170	1180	1190	1200
*	*	*	*	*	*
ACGGG	CTGGT	GCATC	AGCGC	TGGCC	GTTCC
TGCCC	GACCA	CGTAG	TCGCG	ACCGG	CAAGG
CAATA	TAGGG	CGCGT	TCCCC	ATACG	GTCTG
1210	1220	1230	1240	1250	1260
*	*	*	*	*	*
GCCTG	TATCA	GGCCC	ACCGC	CTGCA	CCATG
CGGAC	ATAGT	CCGGG	TGGCG	GACGT	GGTAC
GCCAG	CTCCC	CGCGC	TGGTA	ACGCA	GTCGA
1270	1280	1290	1300	1310	1320
*	*	*	*	*	*
TCGGC	TTCAT	CTATG	CGCCC	CCGGT	CGACA
AGCCG	AAGTA	GATAC	GCGGG	GGCCA	GCTGT
TCGAC	TTCGT	CCTGG	ACTTC	TACAG	CCCGC

C
↓
B
↑

FIG. 6

6/20

1330	1340	E 1350	1360	1370	1380
*	*	*	*	*	*
TGCTG	CGGGC	CGAGG	CGCAG	GAGCG	CACGT
ACGAC	GCCCG	GCTCC	GCGTC	CTCGC	GTGCA
					CTGGG
					TACTG
					CACGA
					CGACC
					GTCCC
					CGCCC
1390	1400	1410	1420	1430	1440
*	*	*	*	*	*
CCTTG	CCAAC	GGGCT	GATCG	CCCTG	GCGCT
GGAAC	GGTTG	CCCGA	CTAGC	GGGAC	CGCGA
					CGCGC
					GCCGC
					GCCGG
					GCTGG
					ACGCG
					CACGA
1450	1460	1470	1480	1490	1500
*	*	*	*	*	*
GCTGC	TGGAC	CATGC	CGCAG	GACCG	TCAGA
CGACG	ACCTG	GTACG	GCGTC	CTGGC	AGTCT
					GCCGG
					TGTGG
					ACCAG
					GACGG
					TGCTG
					GGGCT
1510	1520	1530	1540	1550	1560
*	*	*	*	*	*
CCTGT	CGCCG	GACTG	GCTGG	CGCGG	CTGAA
GGACA	GCGGC	CTGAC	CGACC	GCGCC	GACTT
					CGGGG
					ACGCG
					GCGCG
					GTTGA
					CCGGG
					CTGGT
1570	1580	1590	1600	1610	1620
*	*	*	*	*	*
GGAGG	TGCGC	TTTCC	CCGCC	ATGCC	CGGCG
CCTCC	ACGCG	AAAGG	GGCGG	TACGG	GCCGC
					CGACC
					GGTGG
					CCAAT
					GCCCA
					GCGAC
					CTGCC
1630	1640	1650	1660	1670	1680
*	*	*	*	*	*
GGCGG	CGCTG	GCGGA	TGCGG	TGGTC	CGGTC
CCGCC	GCGAC	CGCCT	ACGCC	ACCAG	GCCAG
					CCCGC
					GGCTC
					TAGGC
					GACCC
					TGTCG
					CTGTA
1690	1700	1710	1720	1730	1740
*	*	*	*	*	*
CGCCC	TGCTG	GATGC	GCAGG	GGGCG	ACGCT
GCGGG	ACGAC	CTACG	CGTCC	CCCGC	TGCGA
					CAGGA
					CGCCG
					TGGGC
					CTAGC
					TCCGC
					CCGCG
1750	1760	1770	1780	1790	1800
*	*	*	*	*	*
GGTCC	TGGAC	GGGCG	GGGCG	CGCAG	CCGTC
CCAGG	ACCTG	CCCGC	CCC GC	GCGTC	GGCAG
					CGCCG
					TAGAC
					TGGCA
					CCCAA
					AGGTC
					TTTAA
1810	1820	1830	1840	1850	1860
*	*	*	*	*	*
CGTGG	GTGTC	GAGAT	CGAGA	CCGAC	CGCCC
GCACC	CACAG	CTCTA	GCTCT	GGCTG	GCGGG
					GGTGC
					CGCAC
					GGGGC
					GGGCT
					ACTAG
					TACCT
1870	1880	1890	1900	1910	1920
*	*	*	*	*	*
CGCGA	CCGTC	ACCCA	GCAGG	ACGGG	TACCG
GCGCT	GGCAG	TGGGT	CGTCC	TGCC	ATGGC
					GAAGT
					AGATA
					GACGA
					CGGGA
					AGAGA
					GGCTG
1930	1940	1950	1960	1970	1980
*	*	*	*	*	*
GCGCA	TCCTG	ATCGA	GGACA	CGCGC	TATTC
CGCGT	AGGAC	TAGCT	CCTGT	GCGCG	ATAAG
					GCTAC
					CGCCG
					CTAGA
					CCTGC
					TGCTG
					CGCGA

FIG. 7

1990	2000	2010	2020	2030	2040
* GGCGG CGGCG TCCCA CGACT ATGCC CGCCA GCAGG GCTGG ACCGG GGCCG AGGTC CGGCG CCGCC GCCGC AGGGT GCTGA TACGG GCGGT CGTCC CGACC TGGCC CCGGC TCCAG GCCGC	* CGAAC GCGGC ATCCT TCCCA TCGCG CTGGC CCATG ATGCG GCGGG CTTCT GGGCC GATCA GCTTG CGCCG TAGGA AGGGT AGCGC GACCG GGTAC TACGC CGCCC GAAGA CCCGG CTAGT	* CGCGG CGGGG CCTGT TCCCG TGGGA CTGCG CGCGG GGTTC TTTCA TCCGG TCACC GGCTA GCGCC GCCCC GGACA AGGGC ACCCT GACGC GCGCC CCAAG AAAGT AGGCC AGTGG CCGAT	* 2110	* 2120	* 2130
* 2140	* 2150	* 2160	* 2170	* 2180	* 2190
* TTCGC TGCCC TATGC GGCAC AGGTG GCGGA CGTGG TGGCG GGTCT GTCCG GGCCG CCCGG AAGCG ACGGG ATACG CCGTG TCCAC GCGCT GCACC ACCGC CCAGA CAGGC CCGGC GGGCC	* 2200	* 2210	* 2220	* 2230	* 2240
* CACCG ACGCG CTGCG CGGCG CCATC CGCGA TTACG CGATC GACCG GGCGC GCCGC GACCG GTGGC TGC GC GACGC GCCGC GGTAG GCGCT AATGC GCTAG CTGGC CCGCG CGGCG CTGGC	* 2250	* 2260	* 2270	* 2280	* 2290
* CTTTC TGCGC CTTTT GAACC GGATG CTGTT CCGCG GCTGC GCGCC CGACC GGCGC TATAC GAAAG ACGCG GAAAA CTTGG CCTAC GACAA GGCGC CGACG CGCGG GCTGG CCGCG ATATG	* 2300	* 2310	* 2320	* 2330	* 2340
* 2350	* 2360	* 2370	* 2380	* 2390	* 2400
* CCTGC TGCAG CGGTT CTACC GCATG CCGCA TGGAC TGATC GAACG GTTCT ATGCC GGCCG GGACG ACGTC GCCAA GATGG CGTAC GGCCT ACCTG ACTAG CTTGC CAAGA TACGG CCGGC	* 2410	* 2420	* 2430	* 2440	* 2450
* GCTGA GCGTG GCGGA TCAGC TGC GC ATCGT GACCG GCAAG CCTCC CATT C CCTT GGCAC CGACT CGCAC CGCCT AGTCG ACGCG TAGCA CTGGC CGTTC GGAGG GTAAG GGGAA CCGTG	* 2460	* 2470	* 2480	* 2490	* 2500
* GGCCA TCCGC TGCCT GCCCG AACGT CCCCT GCTGA AGGAA AACGC ATGAA CGCCC ATTGC CCGGT AGGCG ACGGA CGGGC TTGCA GGGGA CGACT TCCTT TTGCG TACTT GCGGG TAAGC	* 2510	* 2520	* 2530	* 2540	* 2550
* CCC GC GGCCA AGACC GCCAT CGTGA TCGGC GCAGG CTTTG GCGGG CTGGC CCTGG CCATC GGGCG CCGGT TCTGG CGGTA GCACT AGCCG CGTCC GAAAC CGCCC GACCG GGACC GGTAG	* 2560	* 2570	* 2580	* 2590	* 2600
* CGCCT GCAGT CCGCG GGCAT CGCCA CCACC CTGGT CGAGG CCCGG GACAA GCCCG GCGGG GCGGA CGTCA GGCGC CCGTA GCGGT GGTGG GACCA GCTCC GGGCC CTGTT CCGGC CGCCC	* 2610	* 2620	* 2630	* 2640	* 2650

2650	2660	2670	2680	2690	2700						
*	*	*	*	*	*						
CGCGC	CTATG	TCTGG	CACGA	TCAGG	GCCAT	CTCTT	CGACG	CGGGC	CCGAC	CGTCA	TCACC
GCGCG	GATAC	AGACC	GTGCT	AGTCC	CGGTA	GAGAA	GCTGC	GCCCG	GGCTG	GCAGT	AGTGG
2710	2720	2730	2740	2750	2760						
*	*	*	*	*	*						
GACCC	CGATG	CGCTG	AAAGA	GCTGT	GGGCC	CTGAC	CGGGC	AGGAC	ATGGC	GCGCG	ACGTG
CTGGG	GCTAC	GCGAC	TTTCT	CGACA	CCCGG	GACTG	GCCCG	TCCTG	TACCG	GCGCG	TGCAC
2770	2780	2790	2800	2810	2820						
*	*	*	*	*	*						
ACGCT	GATGC	CGGTC	TCGCC	CTTCT	ATCGG	CTGAT	GTGGC	CGGGC	GGGAA	GGTCT	TCGAT
TGCGA	CTACG	GCCAG	AGCGG	GAAGA	TAGCC	GACTA	CACCG	GCCCG	CCCTT	CCAGA	AGCTA
2830	2840	2850	2860	2870	2880						
*	*	*	*	*	*						
TACGT	GAACG	AGGCC	GATCC	AGGGT	CTGGG	TCTTG	CCGTG	CCAGG	TGAAG	CTGTT	GCCGT
ATGCA	CTTGC	TCCGG	CTAGG	TCCCA	GACCC	AGAAC	GGCAC	GGTCC	ACTTC	GACAA	CGGCA
2886											
*											
GGATC	C										
CCTAG	G										

FIG. 9

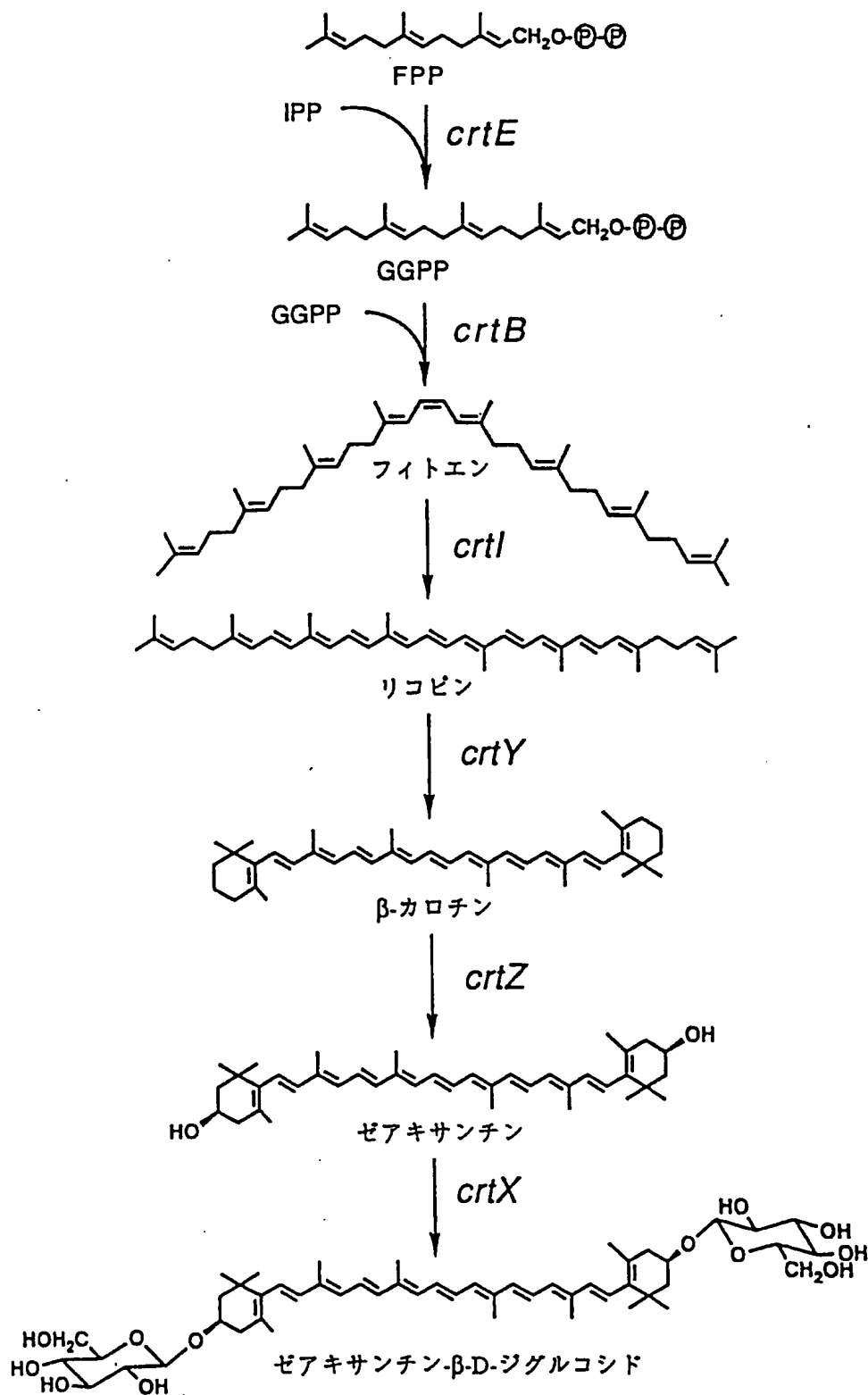


FIG. 10

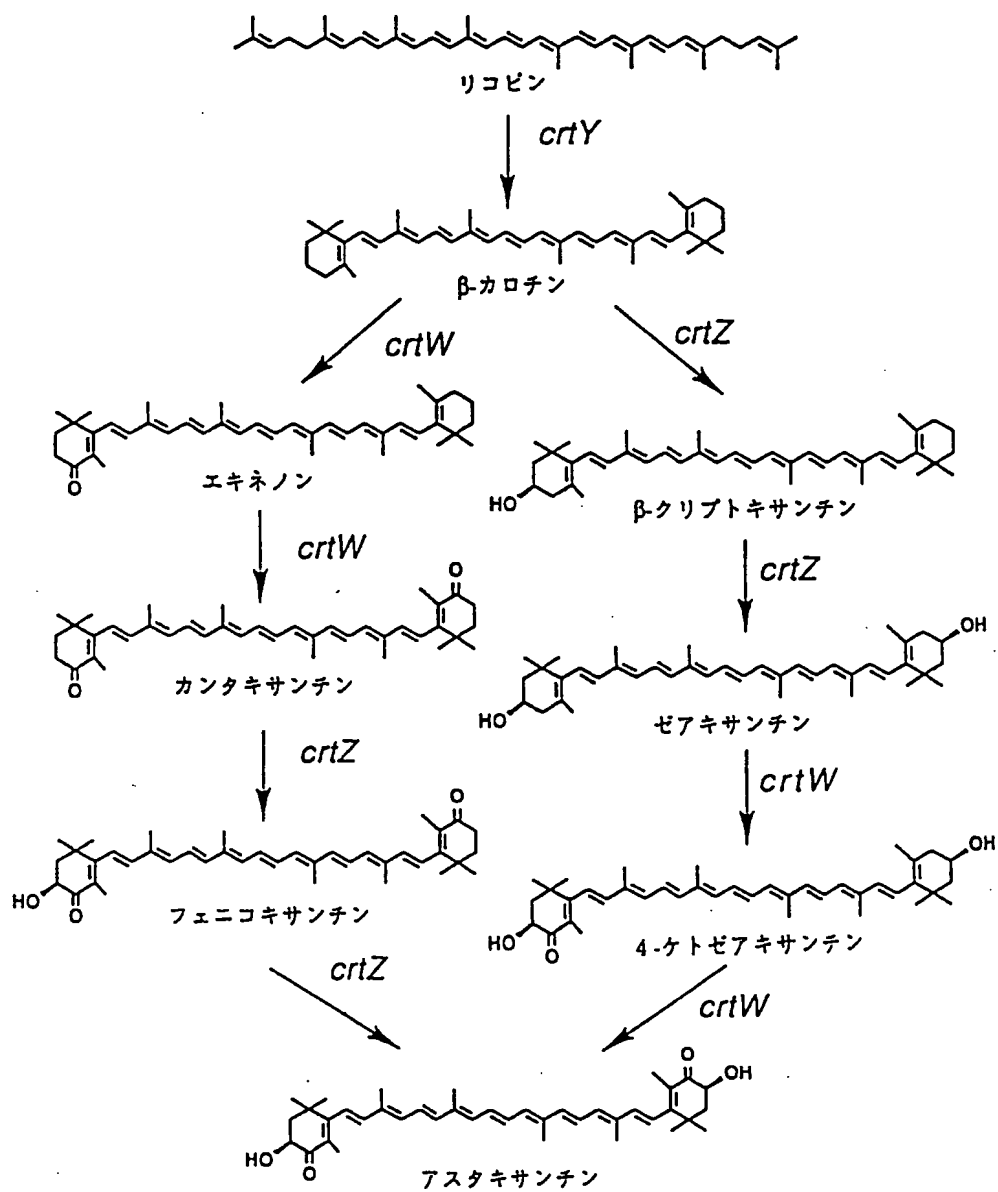


FIG. II

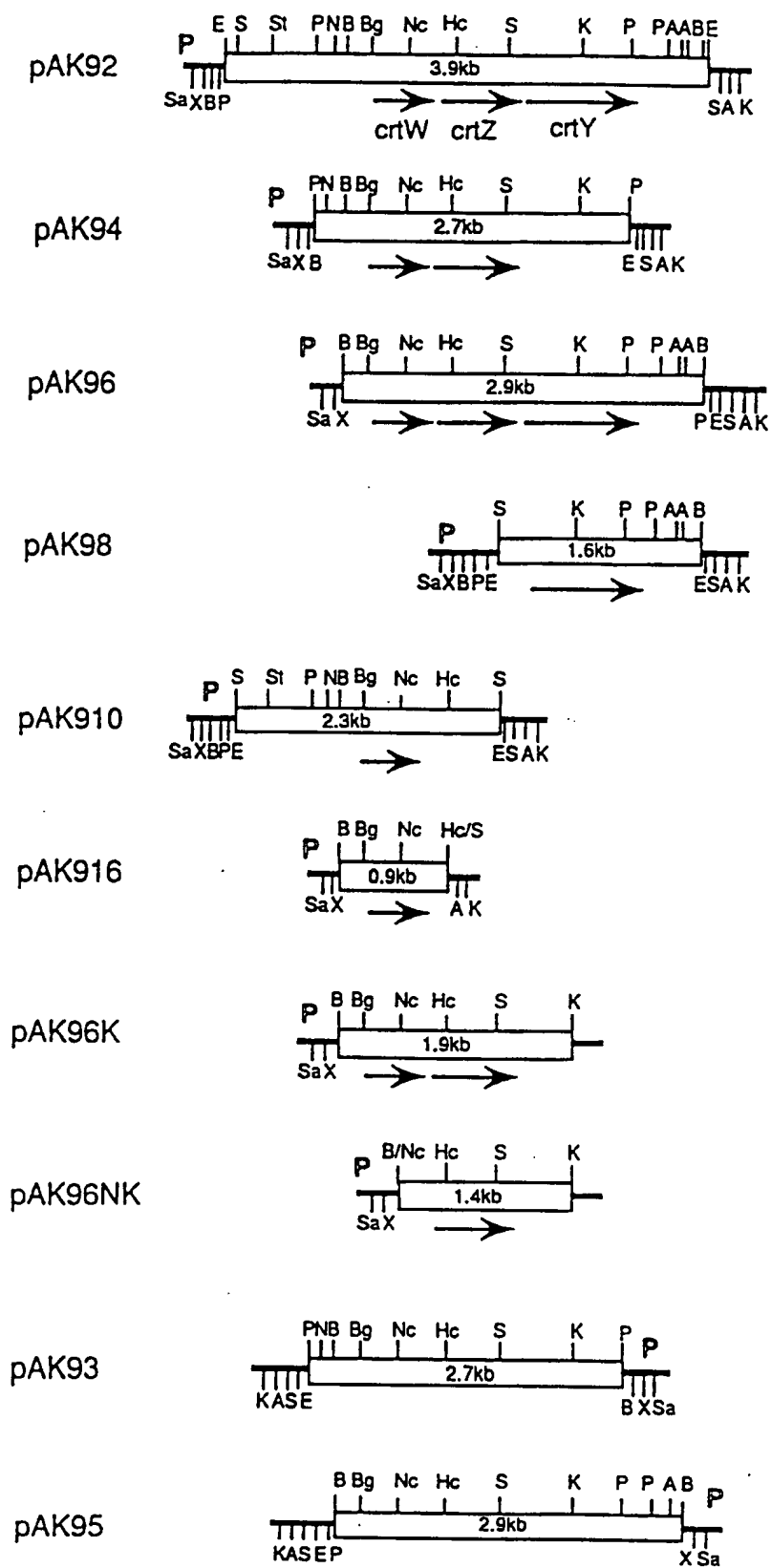


FIG. 12
12 / 20

A ↓

	110	120	130	140	150	
	ATGTCCGGACGGAAGCCTGGCACAACCTGGCGACACGATCGTCAATCTCGGTCTGACCGCC					
1	MetSerGlyArgLysProGlyThrThrGlyAspThrIleValAsnLeuGlyLeuThrAla					
	160	170	180	190	200	210
	GCGATCCTGCTGTGCTGGCTGGTCTGCACGCCTTTACGCTATGGTTGCTAGATGCGGCC					
21	AlaIleLeuLeuCysTrpLeuValLeuHisAlaPheThrLeuTrpLeuLeuAspAlaAla					
	220	230	240	250	260	270
	GCGCATCCGCTGCTTGCCGTGCTGTGCCTGGCTGGGCTGACCTGGTGTGCGGTGCGGCTG					
41	AlaHisProLeuLeuAlaValLeuCysLeuAlaGlyLeuThrTrpLeuSerValGlyLeu					
	280	290	300	310	320	330
	TTCATCATCGCGCATGACGCAATGCACGGGTCCGTGGTGCCGGGGCGGCCGCGCCCAAT					
61	PheIleIleAlaHisAspAlaMetHisGlySerValValProGlyArgProArgAlaAsn					
	340	350	360	370	380	390
	GCGGCGATCGGGCAACTGGCGCTGTGGCTCTATGCGGGGTCTCTCGTGGCCCAAGCTGATC					
81	AlaAlaIleGlyGlnLeuAlaLeuTrpLeuTyrAlaGlyPheSerTrpProLysLeuIle					
	400	410	420	430	440	450
	GCCAAGCACATGACGCATCACCGGCACGCCGGCACCGACAACGATCCCGATTTCGGTCAC					
101	AlaLysHisMetThrHisHisArgHisAlaGlyThrAspAsnAspProAspPheGlyHis					
	460	470	480	490	500	510
	GGAGGGCCCGTGCGCTGGTACGGCAGCTTCGTCTCCACCTATTTTCGGCTGGCGAGAGGGA					
121	GlyGlyProValArgTrpTyrGlySerPheValSerThrTyrPheGlyTrpArgGluGly					
	520	530	540	550	560	570
	CTGCTGCTACCGGTGATCGTCACCACCTATGCGCTGATCCTGGGCGATCGCTGGATGTAT					
141	LeuLeuLeuProValIleValThrThrTyrAlaLeuIleLeuGlyAspArgTrpMetTyr					
	580	590	600	610	620	630
	GTCATCTTCTGGCCGGTCCCGGCCGTTCGGCGTCGATCCAGATTTTCGTCTTCGGAAC					
161	ValIlePheTrpProValProAlaValLeuAlaSerIleGlnIlePheValPheGlyThr					
	640	650	660	670	680	690
	TGGCTGCCCCACCGCCCGGGACATGACGATTTTCCCGACCGGCACAACGCGAGGTGCGACC					
181	TrpLeuProHisArgProGlyHisAspAspPheProAspArgHisAsnAlaArgSerThr					
	700	710	720	730	740	750
	GGCATCGGCGACCCGTTGTCACTACTGACCTGCTTCCATTTCGGCGGCTATCACCACGAA					
201	GlyIleGlyAspProLeuSerLeuLeuThrCysPheHisPheGlyGlyTyrHisHisGlu					

FIG. 13

760 770 780 790 800 810
CATCACCTGCATCCGCATGTGCCGTGGTGGCGCCTGCCTCGTACACGCAAGACCGGAGGC
221 HisHisLeuHisProHisValProTrpTrpArgLeuProArgThrArgLysThrGlyGly

820 827
CGCGCATGA
241 ArgAla***

↑
B

FIG. 14

C↓

830 840 850 860 870 880
ATGACGCAATTCCTCATTGTCGTGGCGACAGTCCTCGTGATGGAGCTGACCGCCTATTCC
1 MetThrGlnPheLeuIleValValAlaThrValLeuValMetGluLeuThrAlaTyrSer

890 900 910 920 930 940
GTCCACCGCTGGATTATGCACGGCCCCCTAGGCTGGGGCTGGCACAAGTCCCATCACGAA
21 ValHisArgTrpIleMetHisGlyProLeuGlyTrpGlyTrpHisLysSerHisHisGlu

950 960 970 980 990 1000
GAGCAGGACCACGCGTTGGAGAAGAACGACCTCTACGGCGTCGTCTTCGCGGTGCTGGCG
41 GluHisAspHisAlaLeuGluLysAsnAspLeuTyrGlyValValPheAlaValLeuAla

1010 1020 1030 1040 1050 1060
ACGATCCTCTTCACCGTGGGCGCCTATTGGTGGCCGGTGCTGTGGTGGATCGCCCTGGGC
61 ThrIleLeuPheThrValGlyAlaTyrTrpTrpProValLeuTrpTrpIleAlaLeuGly

1070 1080 1090 1100 1110 1120
ATGACGGTCTATGGGTGATCTATTTTCATCCTGCACGACGGGCTTGTGCATCAACGCTGG
81 MetThrValTyrGlyLeuIleTyrPheIleLeuHisAspGlyLeuValHisGlnArgTrp

1130 1140 1150 1160 1170 1180
CCGTTTCGGTATATTCCGCGCGGGGGCTATTTCCGCAGGCTCTACCAAGCTCATCGCCTG
101 ProPheArgTyrIleProArgArgGlyTyrPheArgArgLeuTyrGlnAlaHisArgLeu

1190 1200 1210 1220 1230 1240
CACCACGCGGTCGAGGGGCGGGACCACTGCGTCAGCTTCGGCTTCATCTATGCCCCACCC
121 HisHisAlaValGluGlyArgAspHisCysValSerPheGlyPheIleTyrAlaProPro

1250 1260 1270 1280 1290 1300
GTGGACAAGCTGAAGCAGGATCTGAAGCGGTGCGGTGCTCTGCGCCCCCAGGACGAGCGT
141 ValAspLysLeuLysGlnAspLeuLysArgSerGlyValLeuArgProGlnAspGluArg

1312
CCGTCGTGA
161 ProSer***

↑D

FIG. 15

10	20	30	40	50	60
CTGCA	GGCCG	GGCCC	GGTGG	CCAAT	GGTCG
GACGT	CCGGC	CCGGG	CCACC	GGTTA	CCAGC
70	80	90	100	110	120
CCGGT	CTAGG	CTGTC	GCCCT	ACGCA	GCAGG
GGCCA	GATCC	GACAG	CGGGA	TGCGT	CGTCC
130	140	150	160	170	180
CAACT	GGCGA	CACGA	TCGTC	AATCT	CGGTC
GTTGA	CCGCT	GTGCT	AGCAG	TTAGA	GCCAG
190	200	210	220	230	240
TCCTG	CACGC	CTTTA	CGCTA	TGGTT	GCTAG
AGGAC	GTGCG	GAAAT	GCGAT	ACCAA	CGATC
250	260	270	280	290	300
TGTGC	CTGGC	TGGGC	TGACC	TGGCT	GTCGG
ACACG	GACCG	ACCCG	ACTGG	ACCGA	CAGCC
310	320	330	340	350	360
TGCAC	GGGTC	CGTGG	TGCCG	GGGCG	GCCGC
ACGTG	CCCAG	GCACC	ACGGC	CCCGC	CGGCG
370	380	390	400	410	420
TGTGG	CTCTA	TGCGG	GGTTC	TCGTG	GCCCA
ACACC	GAGAT	ACGCC	CCAAG	AGCAC	CGGGT
430	440	450	460	470	480
GGCAC	GCCGG	CACCG	ACAAC	GATCC	CGATT
CCGTG	CGGCC	GTGGC	TGTTG	CTAGG	GCTAA
490	500	510	520	530	540
GCAGC	TTCGT	CTCCA	CCTAT	TTCGG	CTGGC
CGTCG	AAGCA	GAGGT	GGATA	AAGCC	GACCG
550	560	570	580	590	600
CCACC	TATGC	GCTGA	TCCTG	GGCGA	TCGCT
GGTGG	ATACG	CGACT	AGGAC	CCGCT	AGCGA
610	620	630	640	650	660
CCGTT	CTGGC	GTCGA	TCCAG	ATTTT	CGTCT
GGCAA	GACCG	CAGCT	AGGTC	TAAAA	GCAGA
670	680	690	700	710	720
ATGAC	GATTT	TCCCG	ACCGG	CACAA	CGCGA
TACTG	CTAAA	AGGGC	TGGCC	GTGTT	GCGCT

FIG. 16

730	740	750	760	770	780						
TACTG	ACCTG	CTTCC	ATTTC	GGCGG	CTATC	ACCAC	GAACA	TCACC	TGCAT	CCGCA	TGTGC
ATGAC	TGGAC	GAAGG	TAAAG	CCGCC	GATAG	TGGTG	CTTGT	AGTGG	ACGTA	GGCGT	ACACG
790	800	810	820	830	840						
CGTGG	TGGCG	CCTGC	CTCGT	ACACG	CAAGA	CCGGA	GGCCG	CGCAT	GACGC	AATTC	CTCAT
GCACC	ACCGC	GGACG	GAGCA	TGTGC	GTTCT	GGCCT	CCGGC	CGGTA	CTGCG	TTAAG	GAGTA
850	860	870	880	890	900						
TGTCG	TGGCG	ACAGT	CCTCG	TGATG	GAGCT	GACCG	CCTAT	TCCGT	CCACC	GCTGG	ATTAT
ACAGC	ACCGC	TGTCA	GGAGC	ACTAC	CTCGA	CTGGC	GGATA	AGGCA	GGTGG	CGACC	TAATA
910	920	930	940	950	960						
GCACG	GCCCC	CTAGG	CTGGG	GCTGG	CACAA	GTCCC	ATCAC	GAAGA	GCACG	ACCAC	GCGTT
CGTGC	CGGGG	GATCC	GACCC	CGACC	GTGTT	CAGGG	TAGTG	CTTCT	CGTGC	TGGTG	CGCAA
970	980	990	1000	1010	1020						
GGAGA	AGAAC	GACCT	CTACG	GCGTC	GTCTT	CGCGG	TGCTG	GCGAC	GATCC	TCTTC	ACCGT
CCTCT	TCTTG	CTGGA	GATGC	CGCAG	CAGAA	GCGCC	ACGAC	CGCTG	CTAGG	AGAAG	TGGCA
1030	1040	1050	1060	1070	1080						
GGGCG	CCTAT	TGGTG	GCCGG	TGCTG	TGGTG	GATCG	CCCTG	GGCAT	GACGG	TCTAT	GGGTT
CCCCG	GGATA	ACCAC	CGGCC	ACGAC	ACCAC	CTAGC	GGGAC	CCGTA	CTGCC	AGATA	CCCAA
1090	1100	1110	1120	1130	1140						
GATCT	ATTTC	ATCCT	GCACG	ACGGG	CTTGT	GCATC	AACGC	TGGCC	GTTTC	GGTAT	ATTCC
CTAGA	TAAAG	TAGGA	CGTGC	TGCC	GAACA	CGTAG	TTGCG	ACCGG	CAAAG	CCATA	TAAGG
1150	1160	1170	1180	1190	1200						
GCGGC	GGGGC	TATTT	CCGCA	GGCTC	TACCA	AGCTC	ATCGC	CTGCA	CCACG	CGGTC	GAGGG
CGCCG	CCCCG	ATAAA	GGCGT	CCGAG	ATGGT	TCGAG	TAGCG	GACGT	GGTGC	GCCAG	CTCCC
1210	1220	1230	1240	1250	1260						
GCGGG	ACCAC	TGCGT	CAGCT	TCGGC	TTCAT	CTATG	CCCCA	CCCGT	GGACA	AGCTG	AAGCA
CGCCC	TGGTG	ACGCA	GTCGA	AGCCG	AAGTA	GATAC	GGGGT	GGGCA	CCTGT	TCGAC	TTCGT
1270	1280	1290	1300	1310	1320						
GGATC	TGAAG	CGGTC	GGGTG	TCCTG	CGCCC	CCAGG	ACGAG	CGTCC	GTCGT	GATCT	CTGAT
CCTAG	ACTTC	GCCAG	CCCAC	AGGAC	GCGGG	GGTCC	TGCTC	GCAGG	CAGCA	CTAGA	GACTA
1330	1340	1350	1360	1370	1380						
CCCGG	CGTGG	CCGCA	TGAAA	TCCGA	CGTGC	TGCTG	GCAGG	GGCCG	GCCTT	GCCAA	CGGAC
GGGCC	GCACC	GGCGT	ACTTT	AGGCT	GCACG	ACGAC	CGTCC	CCGGC	CGGAA	CGGTT	GCCTG
1390	1400	1410	1420	1430	1440						
TGATC	GCGCT	GGCGA	TCCGC	AAGGC	GCGGC	CCGAC	CTTCG	CGTGC	TGCTG	CTGGA	CCGTG
ACTAG	CGCGA	CCGCT	AGGCG	TTCCG	CGCCG	GGCTG	GAAGC	GCACG	ACGAC	GACCT	GGCAC

C↓

↑B

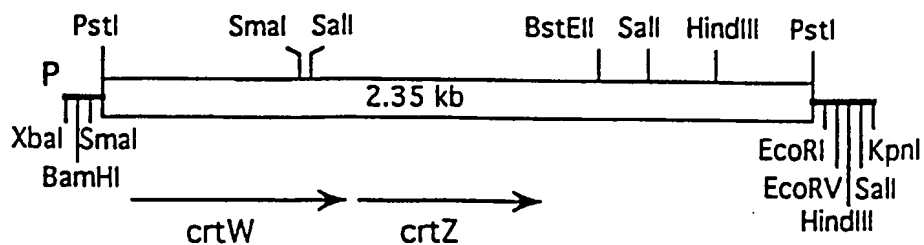
↑D

FIG. 17

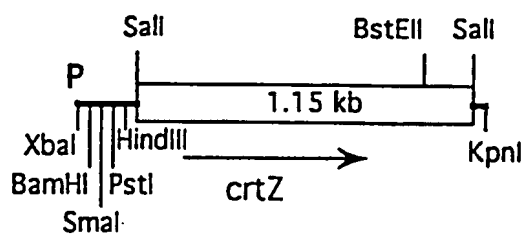
1450	1460	1470	1480	1490	1500						
CGGCG	GGCGC	CTCGG	ACGGG	CATAC	TTGGT	CCTGC	CACGA	CACCG	ATTTG	GCGCC	GCACT
GCCGC	CCGCG	GAGCC	TGCCC	GTATG	AACCA	GGACG	GTGCT	GTGGC	TAAAC	CGCGG	CGTGA
1510	1520	1530	1540	1550	1560						
GGCTG	GACCG	CCTGA	AGCCG	ATCAG	GCGTG	GCGAC	TGGCC	CGATC	AGGAG	GTGCG	GTTCC
CCGAC	CTGGC	GGACT	TCGGC	TAGTC	CGCAC	CGCTG	ACCGG	GCTAG	TCCTC	CACGC	CAAGG
1570	1580	1590	1600	1610	1620						
CAGAC	CATTG	GCGAA	GGCTC	CGGGC	CGGAT	ATGGC	TCGAT	CGACG	GGCGG	GGGCT	GATGC
GTCTG	GTAAG	CGCTT	CCGAG	GCCCG	GCCTA	TACCG	AGCTA	GCTGC	CCGCC	CCCGA	CTACG
1631											
GTGCG	GTGAC	C									
CACGC	CACTG	G									

FIG. 18

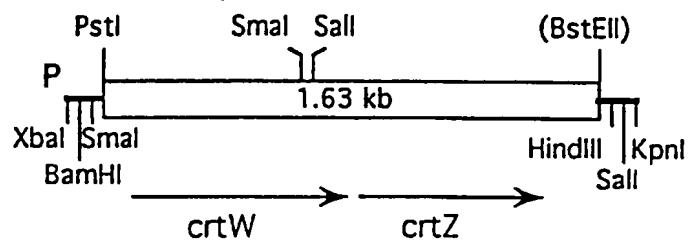
pPC11



pPC13



pPC17



pPC17-3

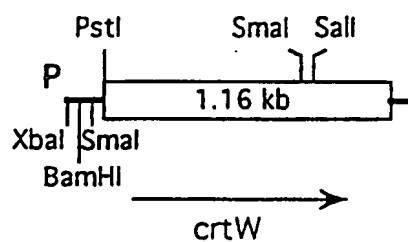


FIG. 19

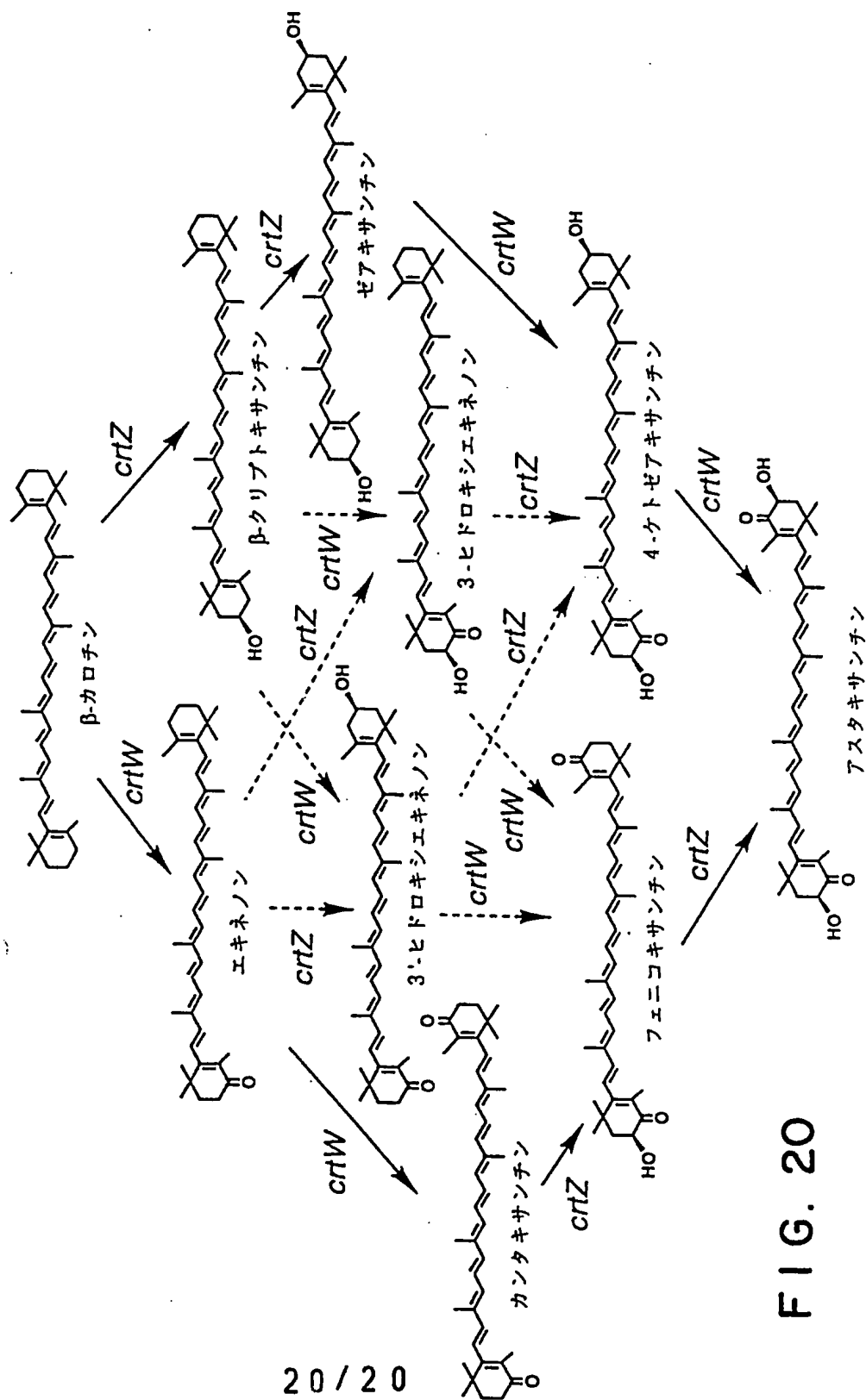


FIG. 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/02220

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/00, C12P7/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/00, C12P7/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, BIOSIS, WPI/WPIL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO, A, 9406918 (Gist-Brocades NV.), March 31, 1994 (31. 03. 94) & EP, A, 586751 & CA, A, 2105957	1-31
A	EP, A, 474347 (Unilever Plc, Quest Int. BV.), March 11, 1992 (11. 03. 92) & JP, A, 5-076347	1-31
A	"Marine bacteria produced astaxanthin" 10th International symposium on carotenoids, abstract, CL11-3(1993)	1-31

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

March 16, 1995 (16. 03. 95)

Date of mailing of the international search report

April 4, 1995 (04. 04. 95)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. C12N15/00, C12P7/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. C12N15/00, C12P7/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CAS ONLINE, BIOSIS, WPI/WPIL		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
E	WO, A, 9406918 (Gist-Brocades NV.), 31. 3月. 1994 (31. 03. 94) & EP, A, 586751 & CA, A, 2105957	1-31
A	EP, A, 474347 (Unilever Plc, Quest Int. BV.), 11. 3月. 1992 (11. 03. 92) & JP, A, 5-076347	1-31
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列举されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日		国際調査報告の発送日
16. 03. 95		04. 04. 95
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 種 村 慈 樹 4 B 9 3 5 9 電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	<p>"Marine bacteria produced astaxanthin" 10th International symposium on carotenoids, abstract, CL11-3 (1993)</p>	1-31